



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

**Die funktionelle Bedeutung der
thrombozytären Sphingosinkinase 1 und 2
in der arteriellen Thrombose**

Florian Reinfried Gärtner



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen

Deutsches Herzzentrum München

des Freistaates Bayern

Die funktionelle Bedeutung der thrombozytären Sphingosinkinase 1 und 2 in der arteriellen Thrombose

Florian Reinfried Gärtner

Vollständiger Abdruck der von der
Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz
3. Univ.-Prof. Dr. H. Berger

Die Dissertation wurde am 07.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Die funktionelle Bedeutung der thrombozytären Sphingosinkinase 1 und 2 in der arteriellen Thrombose

am Deutschen Herzzentrum München, unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn

Prof. Dr. med. Steffen Massberg

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

München, den 19.12.2012

(Florian Reinfried Gärtner)

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Steffen Massberg für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und für die vielen Ratschläge und die Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit. Besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen Nicole Urtz, Michael Lorenz, Marie-Luise von Brühl, Verena Barocke und Christian Schulz, die mich in die hier angewandte Methodik eingewiesen haben und mir stets mit konstruktivem Feedback zu Seite standen.

Für meine Eltern, meine Großmutter und meine Freundin.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichniss	xii
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Die funktionelle Rolle der Thrombozyten in der arteriellen Thrombose . . .	1
1.2 Das Sphingolipid S1P und seine Rolle in der Thrombozytenfunktion . . .	4
1.3 Grundlegende Begriffsdefinitionen der Hämodynamik zum Verständnis des verwendeten Flusskammermodells	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Verwendetes Tiermodell	19
2.1.1 Zucht	20
2.1.2 Tierhaltung- und Fütterung	21
2.2 Messung der S1P-Konzentration im Plasma, Thrombozyten und Erythro- zyten	21
2.3 Messung der SphK-Aktivität von Erythrozyten und Thrombozyten . . .	22
2.4 Messung der Arachidonsäure-, Thromboxan B ₂ -, Prostaglandin E ₂ - und ATP-Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten	23
2.5 Morphologische Analyse der Thrombozyten	24
2.6 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	25
2.6.1 Definition der Fluoreszenz	25
2.6.2 Das Fluoreszenzmikroskop	27
2.6.3 Der Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluoreszein Diazetat, Succin- imidylester (5(6)-CFDA, SE)	34
2.7 <i>In vitro</i> -Analyse der Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen . .	34
2.7.1 Aufbau der Flusskammer	35
2.7.2 Funktionsweise der Perfusionspumpe	36
2.7.3 Erstellung der Perfusionslösung	38
2.7.4 Durchführung der Perfusion	42
2.7.5 Quantifizierung der Daten	42
2.8 Untersuchung der Thrombozytenaggregation im Vollblutaggregometer . .	44
2.8.1 Messprinzip und Aufbau des Multiplate Systems	44

2.8.2	Präparation des murinen Vollblutes und Versuchsablauf	47
2.9	<i>In vivo</i> -Analyse der Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen . . .	47
2.9.1	Wahl und Durchführung der Narkose	48
2.9.2	Operationstechnik	49
2.9.3	Intravitalmikroskopische Darstellung des Denudationsschadens . .	52
2.9.4	Quantifizierung der Daten	53
2.10	<i>In vivo</i> -Analyse der Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach Gefäßwandschädigung mittels Eisen(III)-chlorid	54
2.10.1	Operationstechnik	54
2.10.2	Intravitalmikroskopische Darstellung der Thrombusformation nach Gefäßwandschädigung mittels Eisen(III)-chlorid	56
2.10.3	Quantifizierung der Daten	56
2.11	Versuchstierzahlen und Statistik	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Sphingosinkinase 2 ist die dominante Isoform in Thrombozyten und für die S1P-Bildung und -Freisetzung verantwortlich	59
3.2	Thrombozytäres S1P beeinflusst den Plasma-S1P-Spiegel	61
3.3	SphK1- und SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen eine unauffällige Mor- phologie	63
3.4	SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen nach Aktivierung eine verminder- te Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten	65
3.5	SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen eine normale Adhäsion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	67
3.6	SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen eine verminderte Aggregation im Vollblut und eine reduzierte Thrombusformation in einem Mausmodell der Eisen(III)-chlorid-Gefäßläsion <i>in vivo</i>	74
4	Diskussion	80
5	Zusammenfassung/Summary	91
	Literaturverzeichnis	93
	Anhang	111

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation	3
1.2	Schematische Darstellung des S1P-Metabolismus	5
1.3	Charakteristika des laminaren Flussprofils	13
1.4	Schematische Darstellung der Scherrate	14
1.5	Einfluss der Wandscherkraft auf die Thrombozytenadhäsion	15
1.6	Nomogramm zur Bestimmung der Wandscherkraft	17
2.1	Jablonskidiagramm	26
2.2	Zusammenhang zwischen den Energieniveaus eines Fluorophors und den entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren am Beispiel des Farbstoffs FITC	27
2.3	Mikroskopdesigns: Das Inverted- und Uprightmikroskop	28
2.4	Emissionsspektrum der Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe	29
2.5	Emissionsspektrum der Xenon-Kurzbogenlampe	30
2.6	Aufbau und Strahlengang eines Filtercubes	30
2.7	Schematische Darstellung eines CCD-Arrays	33
2.8	Das Fluorophor CFDA-SE	34
2.9	Adhäsion CFDA-SE-markierter Thrombozyten auf funktionalisiertem Ibidi-Slide μVI	35
2.10	Das Ibidi-Perfusionssystem	37
2.11	Die Steuerungssoftware PumpControl	39
2.12	Zellfraktionen nach Auftrennung des Vollblutes durch Ficoll-Plaque-Plus Gradientenzentrifugation	41
2.13	Dokumentationsschema der Thrombozytenadhäsion in der Ibdiflusskammer	42
2.14	Bestimmung der Grauwertschwelle zur Quantifizierung adhärenter Thrombozyten nach Flusskammerperfusion	43
2.15	Elektronenmikroskopische Darstellung der Thrombozytenaggregation in der Impedanzaggregometrie	45
2.16	Schematischer Aufbau einer Multiplate Messzelle	46
2.17	Dokumentation der Aggregation durch die Multiplatesoftware	47
2.18	Lage des Femoraliskatheters zur Applikation fluoreszenzmarkierter Thrombozyten	50
2.19	Schematische Darstellung der Endotheldenudation im Drahtmodell der Maus	52

2.20	Aufnahmelokalisationen zur Darstellung der Denudation	53
2.21	Zeitschema der Videodokumentation nach Denudation	53
2.22	Schematische Darstellung der intravitalem FeCl ₃ -Verletzung der Arteria Carotis Communis	55
2.23	Zeitschema der Videodokumentation nach FeCl ₃ -Gabe	56
3.1	S1P-Konzentration und SphK-Aktivität in Thrombozyten	60
3.2	S1P-Konzentration und SphK-Aktivität in Erythrozyten	61
3.3	S1P-Plasmaspiegel SphK-defizienter Tiere	62
3.4	Transmissionselektronenmikroskopie SphK-defizienter Thrombozyten . .	63
3.5	Darstellung der Thrombozytenvolumina SphK-defizienter Thrombozyten	64
3.6	SphK2-defiziente-Tiere haben eine verminderte Thrombozytenzahl	64
3.7	Thrombozytensekretion und Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten nach Thrombinaktivierung	66
3.8	Thrombozytenadhäsion im Flusskammermodell	67
3.9	Mikrographien der Thrombozytenadhäsion im Flusskammermodell	68
3.10	Darstellung der Thrombozytenadhäsion nach Denudation der Arteria Carotis Communis	69
3.11	Thrombozytenadhäsion nach Denudation der Arteria Carotis Communis	70
3.12	Mikrographien nach Denudation der Arteria Carotis Communis einer Wildtyp-Maus	71
3.13	Mikrographien nach Denudation der Arteria Carotis Communis einer SphK1-defizienten-Maus	72
3.14	Mikrographien nach Denudation der Arteria Carotis Communis einer SphK2-defizienten-Maus	73
3.15	Vollblutaggregation muriner Thrombozyten in der Impedanzaggregometrie	75
3.16	Vollblutaggregation muriner Thrombozyten in der Impedanzaggregometrie nach Plasmaverdünnung	76
3.17	Intravitalemikroskopische Mikrographien nach FeCl ₃ -Verletzung	77
3.18	Okklusionswahrscheinlichkeit SphK1- und SphK2-defizienter-Tiere nach FeCl ₃ -Verletzung	78
3.19	Darstellung des Okklusionszeitpunktes und der Okklusionsdauer nach FeCl ₃ -Verletzung	79
5.1	Einzeltieranalyse der adhärenenten Thrombozyten von Wildtyp-Tieren nach Denudation der Arteria Carotis Communis	111
5.2	Einzeltieranalyse der Adhäsionsfläche von Wildtyp-Thrombozyten nach Denudation der Arteria Carotis Communis	112
5.3	Einzeltieranalyse der adhärenenten Thrombozyten SphK1-defizienter Tiere nach Denudation der Arteria Carotis Communis	113
5.4	Einzeltieranalyse der Adhäsionsfläche SphK1-defizienter-Thrombozyten nach Denudation der Arteria Carotis Communis	114
5.5	Einzeltieranalyse der adhärenenten Thrombozyten SphK2-defizienter Tiere nach Denudation der Arteria Carotis Communis	115

5.6 Einzeltieranalyse der Adhäsionsfläche SphK2-defizienter-Thrombozyten
nach Denudation der Arteria Carotis Communis 116

Tabellenverzeichnis

2.1	Funktionalisierung der Flusskammerkanäle	36
3.1	Messung der Gefäßokklusion im FeCl ₃ -Modell der Arteria Carotis Communis	78
5.1	Versuchsplanung zur Plasma-S1P Messung	117
5.2	Versuchsplanung zur Plasma-S1P Messung NE-F2-/- Tiere	117
5.3	Versuchsplanung zur Thrombozyten-S1P Messung	117
5.4	Versuchsplanung zur Erythrozyten-S1P Messung	117
5.5	Versuchsplanung zur SphK-Aktivitätsmessung in Thrombozyten	118
5.6	Versuchsplanung zur SphK-Aktivitätsmessung in Erythrozyten	118
5.7	Versuchsplanung zur TXB ₂ - und PGE ₂ -Freisetzung aus Thrombozyten .	118
5.8	Versuchsplanung zur Arachidonsäurefreisetzung aus Thrombozyten . . .	119
5.9	Versuchsplanung zur ATP-Freisetzung Thrombozyten	119
5.10	Versuchsplanung zur Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>	119
5.11	Versuchsplanung zur Vollblutaggregation <i>in vitro</i>	120
5.12	Versuchsplanung zur Vollblutaggregation <i>in vitro</i>	120
5.13	Versuchsplanung zur Endotheldenudation (Drahtmodell) <i>in vivo</i>	121
5.14	Versuchsplanung zur FeCl ₃ - Läsion <i>in vivo</i>	121

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	Charge-coupled Device
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
Col	Collagen
COX1	Cyclooxygenase 1
EIA	Enzyme Immunoassay
Fbg	Fibrinogen
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HDL	High-Density-Lipoprotein
HPCL	High-Performance Liquid Chromatography
INF	Interferon
Lam	Laminin
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter

μm	Mikrometer
MRP4	Multidrug Resistance Protein 4
PAR	Protease Activated Receptor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PRP	Plättchenreiches Plasma
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SphK	Sphingosinkinase
SPL	S1P-Lyase
SPP	S1P-Phosphatase
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
TLC	Thin-Layer-Chromatography
vWF	von Willebrandfaktor
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die funktionelle Rolle der Thrombozyten in der arteriellen Thrombose

Thrombozyten sind sehr kleine, etwa $1\mu\text{m}$ große, kernlose Zellfragmente, die von Megakaryozyten im Knochenmark gebildet und von dort direkt in die Zirkulation freigesetzt werden (Italiano et al., 1999; Junt et al., 2007; Zhang et al., 2012). Täglich werden auf diese Weise Millionen von Thrombozyten produziert, die durch das Gefäßsystem zirkulieren und erst im Falle einer Gefäßverletzung lokal aktiviert werden (Sternberg and Levin, 1989). Bei Verletzung der arteriellen Gefäßwand kommt es in einem hoch-effizienten, mehrstufigen Prozess zur Rekrutierung zirkulierender Thrombozyten an den Ort der Läsion (Denis and Wagner, 2007). Der erste Schritt der Thrombozytenrekrutierung wird als „Tethering“ bezeichnet und wird vor allem durch die Bindung der Plättchenrezeptoren GPIIb und GPIIb/IIIa an ihre Liganden von Willebrand Faktor und Kollagen vermittelt (Savage et al., 1998; Massberg et al., 2003; Bergmeier et al., 2006). Das „Tethering“ ist der „Erstkontakt“ mit dem Endothel und führt zum sogenannten „Rolling“ an der Gefäßwand (Savage et al., 1996). Die Liganden-Rezeptorinteraktion initiiert intrazelluläre Signalkaskaden („Outside-In Signalling“), die zur Aktivierung der Thrombozyten und der hiermit verbundenen Aktivierung sogenannter Integrinrezeptoren („Inside-Out Signalling“) führen (Li et al., 2010). Bedeutende Integrine sind v.a. das $\alpha_2\beta_1$ Integrin, das die Bindung an Kollagen vermittelt und das am meisten exprimierte $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin, welches v.a. an Fibrinogen, aber auch an Fibronectin, Vitronectin und von Willebrand Faktor bindet (Bennett et al., 2009). Die Integrinaktivierung ist eine entscheidende Voraussetzung für die feste Adhäsion der Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand. Der Prozess der Thrombozytenaktivierung wird dabei neben der Matrixrezeptor-vermittelten Kontaktaktivierung vor allem über den starken Thrombo-

zytenagonisten Thrombin vermittelt. Diese Serinprotease wird Tissue-Factor-vermittelt in hohen Konzentrationen an der Thrombozytenoberfläche aus Prothrombin gebildet und bewirkt über die Bindung an die Thrombozytenrezeptoren PAR 1 und PAR 4 (in der Maus PAR3 und PAR4) die stärkste Thrombozytenaktivierung (Weiss et al., 2002; Dubois et al., 2006; Mangin et al., 2006; Coughlin, 2005; Cornelissen et al., 2010). In einer zweiten Welle der Aktivierung kommt es daraufhin zur Freisetzung der sogenannten „Secondary Mediator“ Thromboxan A₂ (TXA₂) und Adenosindiphosphat (ADP) (Thomas et al., 1998). TXA₂ ist ein Lipid, das mittels Cyclooxygenase 1 (COX1) aus Arachidonsäure gebildet und wahrscheinlich über den Transporter MRP4 freigesetzt wird (Reid et al., 2003; Jedlitschky et al., 2012). Der weitere bedeutende „Secondary Mediator“ ADP wird in den sogenannten „Dense Granula“ gespeichert, welche nach Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden (Gachet, 2008). Sowohl TXA₂, als auch ADP binden an „G-Protein-Coupled-Receptors“ (GPCRs) und bewirken eine Amplifikation der Plättchenaktivierung mit zusätzlicher Rekrutierung weiterer Thrombozyten an die Gefäßläsion (Offermanns, 2006). Neben den beiden pharmakologisch relevanten Substanzen TXA₂ und ADP werden eine Vielzahl weiterer Substanzen aus dem Granulapool der Thrombozyten freigesetzt. Während die Freisetzung der niedrig molekularen Stoffe der „Dense Granula“, wie vor allem ADP, ATP, Serotonin und Ca²⁺ zur Amplifizierung der Thrombozytenaktivierung führt, werden aus den sogenannten α -Granula vor allem höher molekulare Polypeptide freigesetzt, die eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. Sie beinhalten einerseits Plasmaproteine wie Fibrinogen, Fibronectin und von Willebrand Faktor, die, wie oben beschrieben eine direkte Auswirkung auf die Plättchenfunktion ausüben. Andererseits verfügen sie aber auch über eine Vielzahl von Gerinnungsfaktoren und deren Kofaktoren und Inhibitoren, wodurch sie die Prozesse der sekundären Hämostase entscheidend beeinflussen können (Blair and Flaumenhaft, 2009). Durch die Freisetzung einer Vielzahl von Chemokinen und leukozytenfunktionsmodulierender Substanzen spielen Thrombozyten auch in Prozessen der Inflammation und Angiogenese eine in den letzten Jahren immer besser charakterisierte Rolle (Gleissner et al., 2008). Infolge der beschriebenen Thrombozytensekretion kommt es zur Rekrutierung zusätzlicher Thrombozyten an die bereits bestehende Thrombozytenmonoschicht. Dieser Prozess wird, wie auch die initiale Adhäsion v.a. durch von Willebrand Faktor ermöglicht (Bergmeier et al., 2006). Das Schlüsselmolekül, dass die darauf folgende Aggregation der Thrombozyten im wachsenden Thrombus vermittelt ist $\alpha_{IIb}\beta_3$. So zeigen Patienten, denen dieses Integrin fehlt, bzw. bei denen es dysfunktional ist ein Blutungssyndrom, die sog. Glanzmann Thrombasthenie (Nurden, 2005). Nichtsde-

stotrotz wurde im Laufe der letzten Jahre eine Vielzahl weiterer Moleküle bekannt, die einen modulierenden Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben und deren Dysfunktionalität mit verminderter Thrombose und verlängerter Blutungszeit einhergehen (Denis and Wagner, 2007). Schließlich kommt es zur Thrombusstabilisierung, die sich aus den Prozessen der Thrombusretraktion und der Bildung eines verstärkenden Fibrinnetzes zusammensetzt und dadurch ein Fragmentieren bzw. Wegspülen des Thrombus mit dem Blutstrom verhindert (Ono et al., 2008; Chou et al., 2004). In Abbildung 1.1 werden die oben beschriebenen Prozesse graphisch veranschaulicht dargestellt.

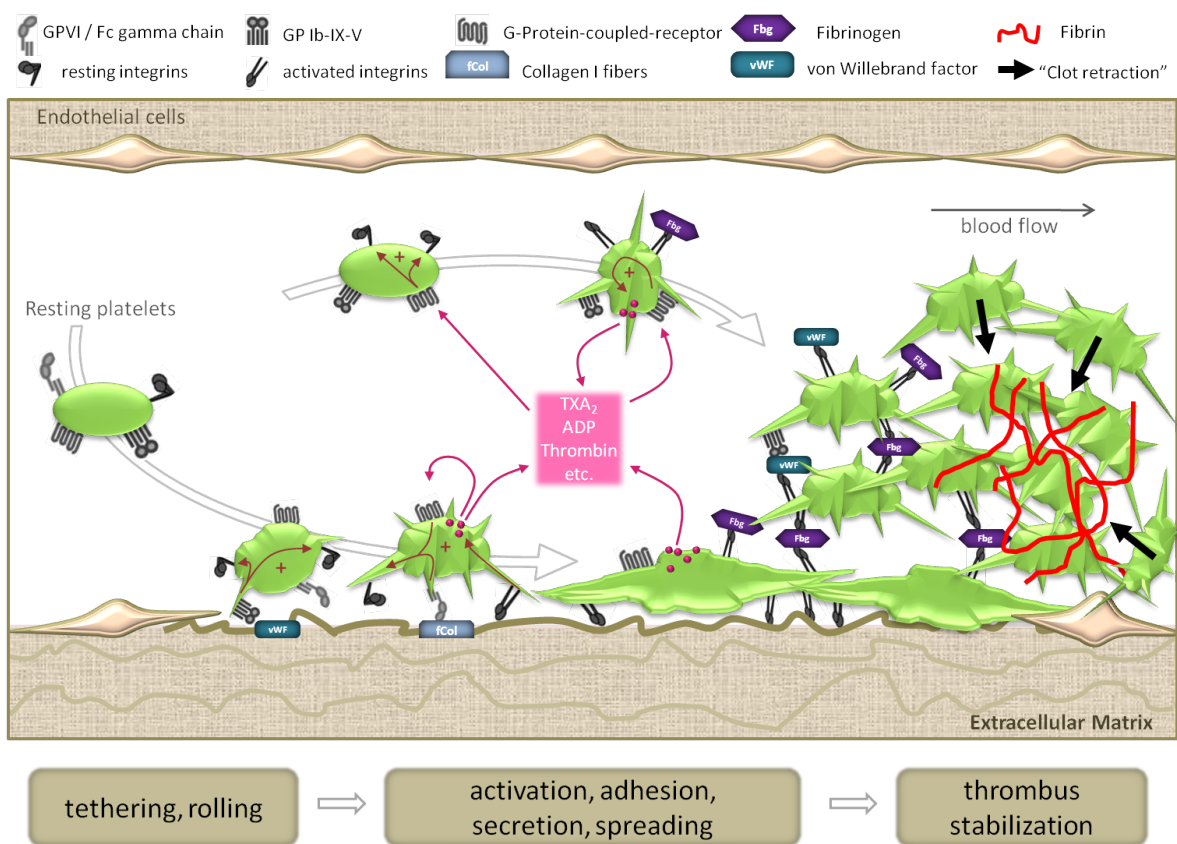


Abbildung 1.1 – .

Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation. Die einzelnen Schritte der Thrombusformation werden im Text detailliert besprochen.

1.2 Das Sphingolipid S1P und seine Rolle in der Thrombozytenfunktion

S1P-Metabolismus Sphingolipide sind ubiquitäre Bestandteile der Zellmembranen von Säugetieren, deren Metabolite als Signalmoleküle in der Regulation zellulärer Prozesse eine bedeutende Rolle spielen. Eines der wichtigsten dieser Metabolite stellt das Sphingosin-1-Phosphat (S1P) dar, dessen Bedeutung als Regulator des Zellwachstums und der Apoptose erst vor 20 Jahren bekannt wurde (Zhang et al., 1991; Olivera and Spiegel, 1993; Cuvillier et al., 1996). Anfangs war es deshalb für seine mögliche Rolle in der Tumorgenese von großem Interesse. In der Zwischenzeit hat sich gezeigt, dass S1P in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt (Maceyka et al., 2012). Einer der Gründe, warum S1P so vielfältige Funktionen ausüben kann, ist wohl seine Fähigkeit sowohl als intrazellulärer Secondmessenger, wie auch extrazellulärer Ligand der fünf bekannten „G-Protein-Coupled Receptors“ (GPCR) (S1PR₁₋₅) zu fungieren (Rosen et al., 2009; Strub et al., 2010). Als Grundgerüst der Sphingosin-1-phosphatbildung dient das, in Eukaryoten spezifisch vorkommende Phospholipid Sphingomyelin. Es ist Bestandteil der Zellmembran und wird mit Hilfe des Enzyms Sphingomyelinase hydrolytisch in Ceramid gespalten (Kolesnick, 1992). Ceramid kann daraufhin durch Ceramidase-katalysierte Hydrolyse in Sphingosin umgewandelt werden. Sphingosin ist Substrat der Sphingosinkinasen (SphK), welche es zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphorylieren (Hait et al., 2006). Neben der S1P-Synthese durch Degradation von Sphingomyelin, existiert noch die Möglichkeit der komplexen *de novo*-Synthese von S1P aus den Molekülen Palmitoyl-CoA und Serin (Merrill, 2002). Auch die *de novo*-Synthese von S1P führt zuerst zur Bildung von Ceramid, wodurch dieses Lipid eine zentrale Rolle in der Regulation der Sphingosinphosphat-Synthese einnimmt (Obinata and Hla, 2012). Der Abbau von S1P kann auf zwei Wegen erfolgen. Durch das S1P-spezifische Enzym S1P-Phosphatase 1 bzw. 2 (SPP1/2) und das unspezifische Enzym Lipidphosphate-Phosphatase (LPP1-3) wird die reversible Dephosphorylierung in Sphingosin katalysiert (Le Stunff et al., 2002; Long et al., 2005). Das Enzym S1P-Lyase (SPL) hingegen katalysiert die irreversible Spaltung von S1P in Phosphoethanolamin und Hexadecenal und führt somit zur finalen Degradation der Sphingolipide (Ikeda et al., 2004). Die beschriebenen Schritte des S1P-Metabolismus werden veranschaulicht in Abbildung 1.2 dargestellt.

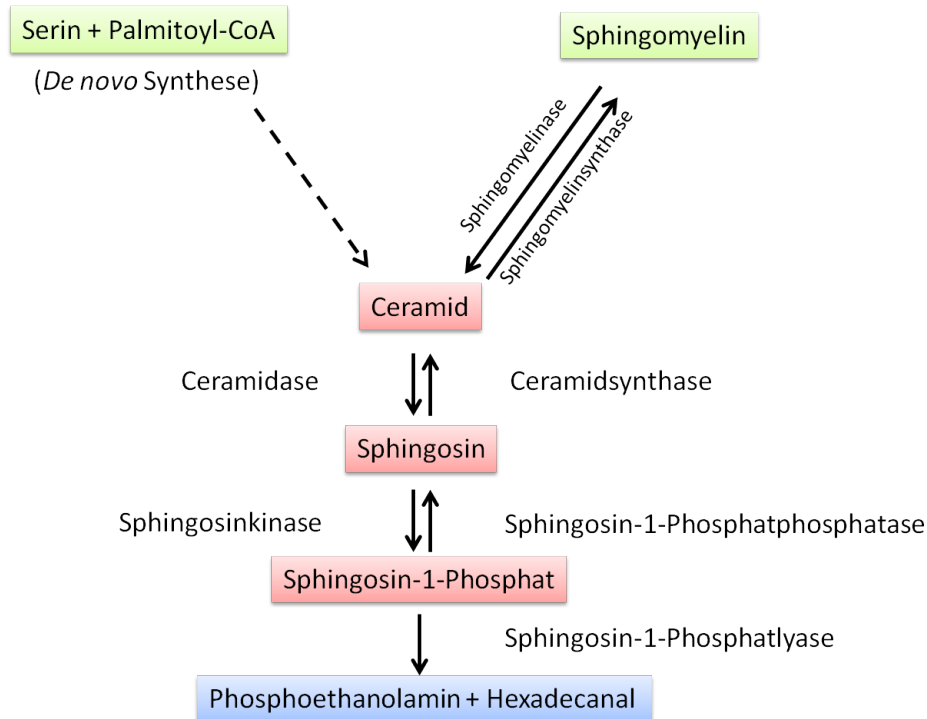


Abbildung 1.2 – Schematische Darstellung des S1P-Metabolismus. Die einzelnen Reaktionsschritte werden im Text detailliert erläutert.

Sphingosinkinasen Säuger besitzen zwei Isoenzyme der Sphingosinkinasen (SphK), SphK1 und SphK2. Beide Enzyme kommen in unterschiedlichen Geweben vor, wobei sie sich in ihrem Expressionsmuster häufig überlappen. SphK1 überwiegt vor allem in der Lunge und der Milz, während Sphk2 die dominierende Isoform in Herz, Gehirn und Leber ist (Kohama et al., 1998; Liu et al., 2000). Beide SphK gehören zur Familie der Diacylglycerolkinasen und besitzen fünf konservierte Domänen, die der Substraterkennung und katalytischen Aktivität dienen (Strub et al., 2010). Sowohl SphK1 als auch SphK2 sind vorwiegend im Zytosol lokalisiert, wobei ihre Verteilung in verschiedenen Zelltypen variiert und durch bestimmte Signale beeinflusst werden kann (Sutherland et al., 2006; Hayashi et al., 2002; Fukuda et al., 2004; Maceyka et al., 2004). SphK1 besitzt eine intrinsische katalytische Aktivität und ist vermutlich als konstitutiv aktives Enzym für die Aufrechterhaltung der niedrigen intrazellulären S1P-Spiegel verantwortlich (Pitson et al., 2000). Nichtsdestotrotz kann ihre Aktivität durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Agonisten gesteigert werden und ist Voraussetzung für die Initialisierung S1P-abhängiger Signalwege. Einer der entscheidenden Mechanismen der SphK1-Aktivierung ist die ERK1/2-vermittelte Phosphorylierung an Ser²²⁵, die zu einer 14fachen Steigerung der Enzymaktivität führt (Pitson et al., 2003). Neben dieser Ak-

tivitätssteigerung führt die Phosphorylierung von Ser²²⁵ zur Translokation der SphK1 aus dem Zytosol an die Zellmembran, eine entscheidende Voraussetzung ihrer Funktionalität (Stahelin et al., 2005). Vergleichsweise wenig ist über die SphK2 bekannt. Sie ist vor allem im Zytosol und im Nukleus lokalisiert (Maceyka et al., 2005). Auch sie kann durch eine Reihe von Agonisten aktiviert werden (Alemany et al., 2007). Interessanterweise ist die Phosphorylierungsstelle Ser²²⁵ der SphK1 in der SphK2 nicht konserviert. Ähnlich der SphK1 findet allerdings im Rahmen der Aktivierung an anderer Stelle, den Residuen Ser³⁵¹ und Tyr⁵⁷⁸ eine ERK1/2-abhängige Phosphorylierung statt (Hait et al., 2007). Eine Translokation an die Plasmamembran bleibt aus, stattdessen kommt es zu einer erhöhten Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum, deren regulierende Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind (Maceyka et al., 2005). Eine Rolle scheint allerdings der N-Terminus des Proteins zu spielen, der sich von dem der SphK1 unterscheidet (Don and Rosen, 2009). Die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der beiden Isoformen scheint eine Voraussetzung für die teils sogar gegensätzlichen Funktionen darzustellen (Maceyka et al., 2005). Neben der Translokation der SphK innerhalb der Zelle, gibt es Beobachtungen, die zeigen, dass SphK auch aus der Zelle freigesetzt werden können. So scheint die Freisetzung der SphK1 aus vaskulären Endothelzellen zum Plasma-S1P-Spiegel beizutragen und die Freisetzung der SphK1 und SphK2 aus apoptotischen Zellen ein chemotaktisches Signal für Phagozyten darzustellen (Venkataraman et al., 2006; Gude et al., 2008). Da es sich aber generell um kleine Mengen handelt die freigesetzt werden, muss die physiologische Relevanz dieses Mechanismus noch weiter geprüft werden (Pitson, 2011).

Homozygote Knockout-Mäuse je einer Isoform der SphK sind lebensfähig und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp (Allende et al., 2004; Mizugishi et al., 2005). Dies lässt darauf schließen, dass sie entweder redundante, überlappende oder kompensatorische Fähigkeiten besitzen. Hingegen sind SphK1^{-/-}/SphK2^{-/-}-Mäuse bei denen alle vier SphK-Allele fehlen nicht lebensfähig und versterben bis zum Zeitpunkt E13.5 *in utero*, aufgrund fehlerhafter Angio- und Neurogenese mit fehlendem Neuralrohrverschluss (Mizugishi et al., 2005). Diese Erkenntnisse zeigen, dass SphK1 und SphK2 zumindest bezüglich der Lebensfähigkeit der jeweiligen Knockoutmaus redundante Eigenschaften besitzen, und dass zumindest eine der beiden SphK für die intakte Embryogenese vorhanden sein muss. Interessanter Weise konnte Pappu et al. mittels konditionaler SphK1/2 Doppelknockoutmaus zeigen, dass diese Tiere bei Induktion 3-5 Tage nach Geburt, trotz 100%iger Reduktion der S1P-Spiegel lebensfähig bleiben (Pappu et al., 2007). Diese Da-

ten zeigen, dass SphK1/2-defiziente adulte Tiere überlebensfähig sind und bilden somit die grundlegende Voraussetzung für einen möglichen pharmakologischen Einsatz SphK-inhibierender Substanzen. Subtilere Untersuchungen auf phänotypische Unterschiede zwischen SphK1^{-/-}- und SphK2^{-/-}-Mäusen lassen vermuten, dass die suggerierte Redundanz in der Embryogenese für eine Reihe pathophysiologischer Situationen nicht zutrifft, und die selektive Inhibition der einzelnen SphK somit unter Umständen neue Präventions- und Therapieoptionen darstellt (Strub et al., 2010). Einer der ersten Hinweise, dass SphK1 und SphK2 unterschiedliche Funktionen in einer Zelle erfüllen können, war die Entdeckung, dass SphK2 im Gegensatz zur bis dato gut charakterisierten wachstumsfördernden, anti-apoptotischen Wirkung der SphK1, eine wachstumshemmende und apoptosefördernde Wirkung aufzeigt (Olivera et al., 1999; Liu et al., 2003; Okada et al., 2005). Diese Erkenntnis lieferte die Grundlage für die Hoffnung auf neue anti-karzinogene Therapieoptionen durch pharmakologische Modulation der SphK. In der Tat konnte in einer Reihe von Tumormodellen der Maus die Bedeutung der SphK1 herausgearbeitet werden: SphK1 korreliert mit der Progression in einem Modell der murinen Erythroleukämie und ist in der Karzinogenese des Kolonkarzinoms hochreguliert (Le Scolan et al., 2005; Kawamori et al., 2006). Die genetische Deletion der SphK1 führt in einem Mausmodell intestinaler Adenome zu deren Wachstumssuppression und die Gabe von SphK-Inhibitoren senkt die Tumorprogression in einem Modell des murinen Mammaadenokarzinoms (Kohno et al., 2006; French et al., 2006). Aber auch andere Krankheitsmodelle belegen die unterschiedliche Bedeutung der Sphinkosinkinasen. Lai et al. konnte zeigen, dass die selektive Inhibition der beiden SphK-Isoformen unterschiedliche, sogar gegensätzliche Ergebnisse in einem Mausmodell der Kollagen-induzierten rheumatoiden Arthritis erbrachte (Lai et al., 2009). Die Herabregulierung der SphK1 durch siRNA-Transfektion senkte die Krankheitsinzidenz und das Ausmaß der artikulären Entzündung mit messbar erniedrigten S1P, IL-6, TNF α , INF γ und IgG2a anti-Kollagen-Ab Werten. SphK2-siRNA behandelte Tiere entwickelten hingegen einen ausgeprägteren Phänotyp der Erkrankung, basierend auf einer erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und einer verstärkten T-Zell Antwort (Lai et al., 2009; Samy et al., 2007). Auch in weiteren Studien konnten unterschiedliche Auswirkung der SphK-Isoformen auf den Krankheitsverlauf unterschiedlicher Pathologien demonstriert werden. So konnte z.B gezeigt werden, dass SphK2 in einem Ischämie-Reperfusionmodell der Niere einen protektiven Effekt und SphK1 u.a. eine schützende Funktion bei der Lipopolysaccharid induzierten Lungenverletzung aufweist (Jo et al., 2008; Wadgaonkar et al., 2009). Von besonderer Bedeutung ist die Rolle von S1P als Regulator des

„Immun- und Stammzelltraffickings“ (Schwab et al., 2005; Massberg et al., 2007). Diese Zellen können hierbei über S1P-Rezeptoren, wobei der S1P-Rezeptor 1 (S1PR1) die bedeutendste Rolle spielt, S1P-Gradienten im Körper wahrnehmen und entlang dieser wandern (Cyster, 2005). So besteht zwischen dem lymphatischen Gewebe und der Lymphe ein S1P Gradient, der die Auswanderung von T-Lymphozyten aus dem Lymphknoten ermöglicht (Schwab et al., 2005). Hierbei sind die interstitiellen S1P-Spiegel niedrig ($<1\text{nM}$), während die S1P-Spiegel in Lymphe und Plasma hoch sind (100nM - $1\mu\text{M}$) (Cyster and Schwab, 2012). Der Großteil des zirkulierenden S1Ps ist dabei an Albumin und „High-density-lipoprotein“ (HDL) gebunden (Yatomi et al., 2000; Sachinidis et al., 1999; Murata et al., 2000). Die S1P-Gradienten werden einerseits durch die lokalisierte SphK-Aktivität, andererseits aber auch durch das S1P degradierende Enzym S1P-Lyase (SPL) aufrechterhalten (Pappu et al., 2007; Schwab et al., 2005). SPL wird in fast allen Geweben, außer in Thrombozyten und Erythrozyten exprimiert (Yatomi et al., 1997; Ikeda et al., 2004; Ito et al., 2007). In Erythrozyten fehlt zusätzlich das zweite S1P-degradierende Enzym, die S1P-Phosphatase (SPP) (Ito et al., 2007). Die SphK Expression in Thrombozyten ist konstitutiv aktiv, wodurch hohe intrazelluläre Mengen an S1P entstehen, welche bei Aktivierung freigesetzt werden können (Banno et al., 1998; Ito et al., 2007). Auch Erythrozyten zeigen eine konstitutiv aktive, wenn auch ca. 9fach niedrigere SphK-Aktivität und können S1P auch Stimulus-unabhängig in das Plasma freisetzen (Ito et al., 2007; Hänel et al., 2007). Das Fehlen der degradierenden Enzyme, bei konstitutiv aktiven SphK spricht für eine vorrangige Rolle, der Thrombozyten und Erythrozyten in der Plasma S1P Freisetzung. Auch Pappu et al. konnten zeigen, dass die Quelle der hohen Plasmaspiegel hauptsächlich hämatopoetische Zellen darstellen, während das S1P der Lymphe wahrscheinlich überwiegend aus den Lymphendothelien stammt (Pappu et al., 2007). Sie konnten des weiteren lymphatische Zellen als Plasma-S1P-Quelle ausschließen und auch der Beitrag des thrombozytären S1P wurde durch den Befund in Frage gestellt, dass NF-E2-defiziente Mäuse, die keine zirkulierenden Thrombozyten besitzen normale S1P-Plasmaspiegel zeigen (Shivdasani et al., 1995; Pappu et al., 2007). Somit lässt sich eine überwiegende Rolle der Erythrozyten als S1P-Quelle vermuten. Hingegen zeigen die Daten von Venkataraman et al., dass die Zusammensetzung des Plasma-S1P-Spiegels nicht ausschließlich durch eine hämatopoetische Quelle zu erklären ist und die endotheliale SphK-Aktivität für die Aufrechterhaltung der S1P-Spiegel in thrombozytopenen, anämischen und leukopenen Mäusen verantwortlich ist (Venkataraman et al., 2008).

Die Rolle von S1P in Thrombozyten Thrombozyten zeigen einige Besonderheiten im Sphingolipidmetabolismus. Sie besitzen zytosolische und membranassoziierte SphK-Isoformen, mit sehr hoher SphK-Aktivität, in etwa 9fach höher als in Erythrozyten (Banno et al., 1998; Murate et al., 2001; Ito et al., 2007). Auch wenn die Hauptaktivität der SphK in der Membranfraktion nachweisbar ist, konnten die beteiligten SphK-Isoformen allerdings noch nicht genau bestimmt werden (Banno et al., 1998). Gleichzeitig fehlt die Expression des, für den irreversiblen S1P-Abbau wichtigen Enzyms S1P-Lyase (Yatomi et al., 1997; Ikeda et al., 2004; Ito et al., 2007). Dies führt zur intrazellulären Akkumulation von S1P in Thrombozyten. Im Ruhezustand wird nur wenig S1P von Thrombozyten in den Überstand abgegeben (Kobayashi et al., 2006). Nach Thrombin-Stimulation kommt es allerdings zur Freisetzung großer S1P-Mengen, ein Grund weshalb Messungen der S1P-Konzentration in Serum und Plasma stark divergieren (Yatomi et al., 1997a). Auf diese Erkenntnisse aufbauend, konnten Deutschman et al. zeigen, dass die Höhe der Serum-S1P-Spiegel als Vorraussageparameter für die Existenz und das Ausmaß von Koronarstenosen geeignet ist (Deutschman et al., 2003). Die S1P-Freisetzung aus Thrombozyten ist Folge einer Proteinkinase C (PKC) Aktivierung und kann durch den PKC-Inhibitor Staurosporin blockiert werden (Yatomi et al., 2000). Auch mechanischer Scherstress führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und zur konsekutiven Erhöhung der thrombozytären S1P-Freisetzung (Aoki et al., 2007). Ulrych et al. konnten zeigen, dass die S1P-Freisetzung in Thrombin- und Kollagen-stimulierten Thrombozyten abhängig von endogener Thromboxanbildung und der darauf folgenden Thromboxanrezeptoraktivierung ist (Ulrych et al., 2011). Der Transport über die Plasmamembran erfolgt hierbei wahrscheinlich Transporter-vermittelt (Kobayashi et al., 2006; Ulrych et al., 2011). Kobayashi et al. zeigten, dass Stimulus-abhängig, verschiedene Mechanismen in der S1P-Freisetzung involviert sind. So kommt es nach Thrombin- und PKC-Aktivierung zur Freisetzung über „ATP-Binding-Cassette“ (ABC)- Transporter, während die S1P-Freisetzung nach Stimulation mittels Ca^{2+} ABC-Transporter unabhängig abläuft (Kobayashi et al., 2006). Eine wichtige Voraussetzung für die effiziente S1P-Freisetzung *in vitro* ist die Anwesenheit von Albumin oder HDL, die wohl an der Ablösung des S1Ps vom Transporter an der Außenseite der Plasmamembran verantwortlich sind (Yatomi et al., 2000; Aoki et al., 2005; Kobayashi et al., 2006). Die physiologische und pathophysiologische Rolle des thrombozytären S1Ps ist weitgehend ungeklärt. Während die beschriebenen Eigenschaften des thrombozytären S1P-Metabolismus anfangs eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Plasma-S1P-Spiegel vermuten ließen (Yatomi et al., 1997a), wurde in einer Reihe weiterer Studien die Redundanz thrombozytären

Plasma-S1Ps nachgewiesen (siehe oben). Die Bedeutung des thrombozytären S1Ps in der Plasma-S1P-Homöostase ist weiterhin unbekannt, es ist allerdings davon auszugehen, dass thrombozytäres S1P nicht die alleinige Hauptquelle des Plasma-S1Ps darstellt. Wie bereits oben beschrieben, sekretieren Thrombozyten nach Stimulation hohe Mengen an S1P (Yatomi et al., 1997a). Dies lässt mögliche parakrine bzw. autokrine Effekte thrombozytären S1Ps vermuten. So konnte u.a. gezeigt werden, dass thrombozytäres S1P, zur S1P-rezeptorabhängigen Ca^{2+} -Mobilisation, Zytoskelettveränderung und Migration „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVECs) führt (Yatomi et al., 2000). Das während der Hämostase freigesetzte thrombozytäre S1P bildet das wichtigste chemotaktische Signal für die zielgerichtete Endothelzellmigration *in vitro* und potenziert den Effekt von „Fibroblast-Growth-Factor b“ (FGF-b) in einem *in vivo*-Modell der kornealen Angiogenese (English et al., 2000). Für eine Vielzahl der bei Thrombozytenaktivierung freigesetzten Substanzen ist eine amplifizierende Rolle in der Thrombusformation bekannt (siehe oben). Die Funktion von S1P in der Thrombusformation wird dabei stark kontrovers diskutiert. Eine rezeptorvermittelte Signaltransduktion des extrazellulären S1Ps scheint prinzipiell möglich. So wurde von Yatomi et al. die Rezeptorbindung von extrazellulärem S1P an einem, mit „Lysophosphatic Acid“ (LPA) gemeinsamen Rezeptor suggeriert (Yatomi et al., 1997). Randriamboavonjy et al. konnten die Expression von S1P-Rezeptor 2 auf Thrombozyten nachweisen, während S1P-Rezeptor 1 und 3 nicht detektierbar waren (Randriamboavonjy et al., 2009). Weitere Studien konnten den S1P-Rezeptor 4 auf mRNA Ebene in Thrombozyten (Motohashi et al., 2000) und die Expression in Megakaryozyten und ihre funktionelle Bedeutung in der Megakaryopoese nachweisen (Golfier et al., 2010). Außerdem konnte unser Labor kürzlich die Expression des S1P-Rezeptor 1 in Megakaryozyten und seine entscheidende Rolle in der Thrombopoese *in vivo* zeigen (Zhang et al., 2012). Die Frage nach der Bedeutung extrazellulären S1Ps für die Thrombozytenfunktion wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Yatomi et al. konnten sowohl eine morphologische Veränderung, als auch die Initiierung einer, wenn auch schwachen Aggregation durch extrazelluläre Gabe von $40\mu\text{M}$ S1P beobachten (Yatomi et al., 1995). Dieser Prozess scheint TXA_2 -unabhängig zu sein und keine Granulasekretion zu induzieren (Yatomi et al., 1995). Des Weiteren wurde ein Synergismus zwischen den schwachen Thrombozytenagonisten ADP und Epinephrin und extrazellulärem S1P beobachtet (Yatomi et al., 1995). Diese Daten unterstützen die Hypothese einer S1P vermittelten Amplifikation der Thrombozytenaggregation (Yatomi et al., 1995). Auch Randriamboavonjy et al. konnten einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und eine Aggregationssteigerung nach S1P-Gabe beobachten (Randriamboavonjy et al.,

2009). Eine andere Studie zeigte hingegen, dass die alleinige extrazelluläre Gabe von S1P keine Thrombozytenaggregation induziert und sogar einen inhibitorischen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation nach Gabe unterschiedlicher Agonisten ausübt (Nugent and Xu, 2000). Auch Ulrych et al. konnten keine aggregationsfördernde Wirkung von S1P beobachten (Ulrych et al., 2011). Neben der kontroversen *in vitro* Datenlage fehlen bis dato Studien die den möglichen Einfluss des thrombozytären S1Ps hinsichtlich der Thrombusformation *in vivo* untersuchen.

1.3 Grundlegende Begriffsdefinitionen der Hämodynamik zum Verständnis des verwendeten Flusskammermodells

In den letzten 35 Jahren wurde immer mehr über die entscheidende Bedeutung der Scherkräfte des fließenden Blutes für die Plättchenadhäsion und Thrombusformation bekannt (de Groot and Sixma, 2007). Der Blutstrom spielt nicht nur für den Transport der Plättchen an den Ort der Läsion eine Rolle, sondern beeinflusst je nach Ausprägung des dynamischen Profils entscheidend die Funktion und Interaktion verschiedener Rezeptoren und Liganden (de Groot and Sixma, 2007). Um die Thrombozytenadhäsion *in vitro* sinnvoll untersuchen zu können, sind deshalb besondere Flusskammersysteme notwendig. Dabei wird versucht die intravaskulären Strömungsbedingungen bestmöglich zu imitieren. Für das Verständnis dieser Methodik müssen die folgenden Begriffe der Hämodynamik erklärt werden.

Strömungsverhalten von Flüssigkeiten Die Strömungsmechanik unterscheidet zwischen laminarer und turbulenter Strömung. In laminaren Strömungen bewegt sich das gesamte Fluid in eine definierte Richtung. Es fließt dabei in Schichten unterschiedlicher Geschwindigkeit, die sich nicht vermischen. In turbulenten Strömungen kommt es hingegen zu unregelmäßigen Änderungen der Fließrichtung. Hierbei variiert die Fließgeschwindigkeit der einzelnen Flüssigkeitsschichten. Beim Ablösen von Flüssigkeitsschichten kommt es durch die einwirkende Reibung zur Bildung von Verwirbelungen (Stöcker, 2004). Ein Maß für das Strömungsverhalten ist die Reynolds-Zahl Re (Busse, 1995):

$$Re = \frac{2r_i \rho v}{\eta} = \frac{2r_i v}{V} \quad (1.1)$$

wobei

Re	Reynolds-Zahl
r_i	Innendurchmesser des Rohres [m]
ρ	Dichte der Flüssigkeit [kg/m^3]
v	Strömungsgeschwindigkeit [m/s]
η	dynamische Viskosität [$Pa \cdot s = N \cdot s/m^2$]
V	kinematische Viskosität [m^2/s]

Die Reynolds-Zahl ist eine dimensionslose Zahl. Ab einer sogenannten kritischen Reynolds-Zahl Re_{krit} , die bei glatten Rohren zwischen 1000 und 2500 liegt, geht eine laminare in eine turbulente Strömung über (Stöcker, 2004). Dabei treten unter Abflachung des Strömungsprofils Wirbel auf, in denen sich Flüssigkeitsteilchen nicht nur parallel, sondern auch quer zur Strömungsrichtung bewegen (Busse, 1995). Durch Vergleich der berechneten, tatsächlichen Reynolds-Zahl mit der kritischen Reynolds-Zahl ist somit eine Strömungsvorhersage möglich.

Fließgeschwindigkeitsprofil In laminaren und stationären, d.h. zeitlich konstanten Strömungen sind die Schichten gleicher Geschwindigkeit konzentrisch angeordnet. Aus der vereinfachenden Annahme der Blutgefäße als zylindrische, glatte und starre Röhren resultiert folgendes Fließgeschwindigkeitsprofil. Die unmittelbar an die Gefäßwand angrenzende Schicht haftet dieser an und besitzt die Geschwindigkeit null. Aufgrund der Reibungskräfte zwischen den einzelnen Flüssigkeitsschichten kommt es zur teleskopartigen Verschiebung der einzelnen Schichten gegeneinander. Hierbei entsteht ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil, mit einem Geschwindigkeitsmaximum im Axialstrom (Whitesides and Stroock, 2001) (siehe Abbildung 1.3).

In Anlehnung an das Hagen-Poiseuille-Gesetz, lässt sich bei stationärer, laminarer Strömung einer homogenen Flüssigkeit in einem starren Rohr die maximale Fließgeschwindigkeit v_{max} nach folgender Formel berechnen (Franke and Wixforth, 2007):

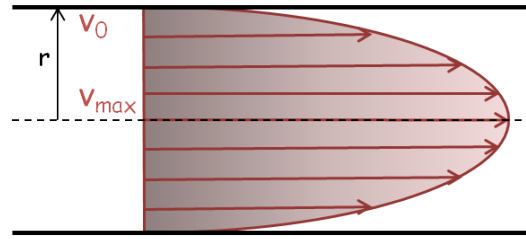


Abbildung 1.3 – Charakteristika des laminaren Flussprofils

$$v_{max} = \frac{\Delta p}{4l\eta} R^2 \quad (1.2)$$

wobei

v_{max}	maximale Fließgeschwindigkeit [m/s]
Δp	Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Rohres [Pa]
l	Länge des Rohres [m]
η	dynamische Viskosität [$Pa \cdot s = Ns/m^2$]
R	Röhrenradius [m]

Scherrate und Scherkraft In einer Röhre beschreibt die Scherrate $\dot{\gamma}$ den lokalen Geschwindigkeitsgradienten dv/dr zweier aneinander angrenzender Flüssigkeitsschichten an der Ortskoordinate r (Formel 1.3) (Kroll et al., 1996). Bei einer hohen Scherrate kommt es also mit Zunahme des Wandabstands zu einem schnellen Anstieg der Fließgeschwindigkeit.

$$\dot{\gamma} = dv/dr \quad (1.3)$$

wobei

$\dot{\gamma}$	Scherrate [$m/s/m$ oder s^{-1}]
v	Fließgeschwindigkeit [m/s]
r	Radius bzw. Ortskoordinate [m]

Mathematisch entspricht dies der Ableitung der Fließgeschwindigkeit v nach der Ortskoordinate r und kann graphisch als Steigung der Tangente an das Fließgeschwindigkeitsprofil dargestellt werden (siehe Abbildung 1.4). Es wird dadurch der lineare Verlauf der Scherrate innerhalb des Kanals, mit dem Minimum in Röhrenmitte r_0 und dem Maximum an der Röhrenwand R ersichtlich (siehe Abbildung 1.4).

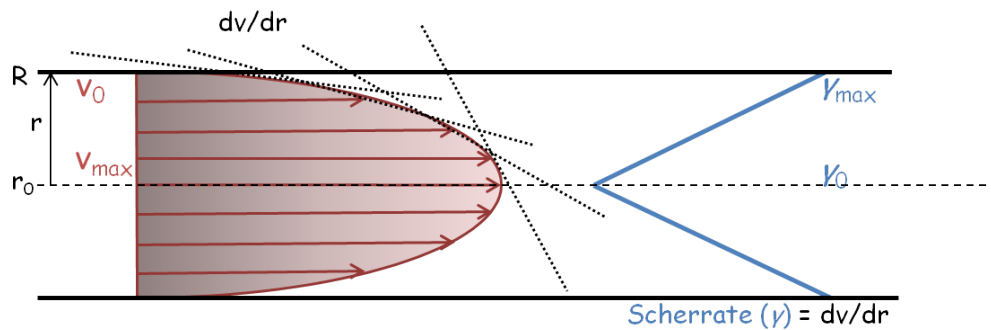


Abbildung 1.4 – Schematische Darstellung der Scherrate (nach Kroll et al. (1996))

Unter den Annahmen, dass das Blut eine ideale Newton'sche Flüssigkeit mit konstanter Viskosität ist und der Blutfluß stationär und laminar durch ein grades, unelastisches und röhrenförmiges Blutgefäß verläuft, kann die Scherrate unter Gültigkeit des Poiseuille'schen Gesetzes wie folgt bestimmt werden (Papaioannou and Stefanadis, 2005):

$$\dot{\gamma} = \frac{8 \cdot v}{d} \quad (1.4)$$

oder

$$\dot{\gamma} = \frac{32 \cdot Q}{\pi \cdot d^3} \quad (1.5)$$

wobei

- $\dot{\gamma}$ Scherrate [$m/s/m$ oder s^{-1}]
- v durchschnittliche Fließgeschwindigkeit [m/s]
- d Gefäßdurchmesser [m]
- Q mittlere volumetrische Strömungsgeschwindigkeit [m^3/s]

Unter Berücksichtigung der rechteckigen Geometrie kann die abgewandelte Formel (1.5) für die Bestimmung der Scherrate auch in „Parallel-Plate Flusskammern“ verwendet werden (Bacabac et al., 2005):

$$\dot{\gamma} = \frac{6 \cdot Q}{b \cdot h^2} \quad (1.6)$$

wobei

h Höhe der Flusskammer [m]

b Breite der Flusskammer [m]

Die wichtigste mechanische Einflussgröße in der Entstehung plättchenvermittelter Häm-ostase und Thrombose ist die Scherkraft (Kroll et al., 1996). Man unterscheidet die Flüssigkeitsscherkraft von der Wandscherkraft. Die Flüssigkeitsscherkraft in einem röhren-

förmigen Blutgefäß bezeichnet die Kraft pro Flächeneinheit, die auf das fließende Blut wirkt (Kroll et al., 1996). Die Wandscherkraft hingegen bezeichnet die Kraft pro Flächeneinheit, die durch das fließende, visköse Blut auf die Gefäßoberfläche wirkt (Kroll et al., 1996). Dadurch nimmt diese direkten Einfluss auf viele biologische Prozesse an der Gefäßwand und ist dadurch eine bedeutsame Einflussgröße in der Pathogenese der Atherosklerose (Shaaban and Duerinckx, 2000) und der arteriellen Thrombose (Wootton and Ku, 1999). Da aktivierte Thrombozyten in der Regel an der verletzten Gefäßinnenwand adhären ist für das Verständnis der Plättchenfunktion eine Erörterung der Wandscherkraft unerlässlich (siehe Abbildung 1.5).

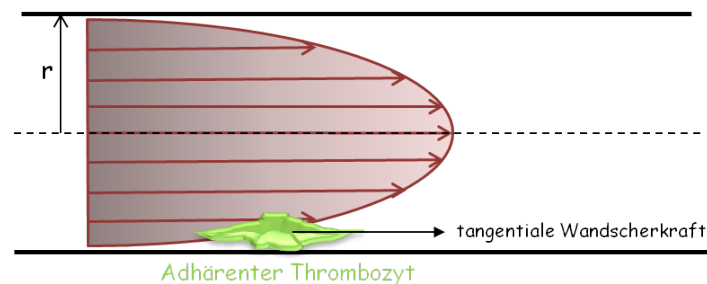


Abbildung 1.5 – Einfluss der Wandscherkraft auf die Thrombozytenadhäsion

Die Wandscherkraft steht über folgende mathematische Formel mit der Scherrate in Zusammenhang (Katritsis et al., 2007):

$$\tau_w = \eta \cdot \dot{\gamma}_w \quad (1.7)$$

wobei

$$\begin{aligned}\dot{\gamma} & \text{ Scherrate [m/s/m oder } s^{-1}] \\ \tau_w & \text{ Wandscherkraft [Pa oder } \textit{dyne/cm}^2] \\ \eta & \text{ dynamische Viskosität [Pa} \cdot \textit{s oder } \textit{dyne s/cm}^2]\end{aligned}$$

Die Gültigkeit dieser Formel ist allerdings nur bei sogenannten Newton'schen Flüssigkeiten gewährleistet. Per definitionem besitzen Newton'sche Flüssigkeiten unabhängig von der Scherrate eine konstante dynamische Viskosität (Katritsis et al., 2007). Diese Eigenschaft trifft z.B. für Wasser oder näherungsweise auch für das Blutplasma zu (Katritsis et al., 2007). Die Berechnung von Scherkräften im Gefäßsystem gestaltet sich durch die besonderen fluidmechanischen Eigenschaften des Blutes als schwierig. Blut ist eine Suspension aus korpuskulären Bestandteilen wie Erythrozyten, Leukozyten und Blutplättchen in Blutplasma. Misst man die dynamische Viskosität des Blutes in Abhängigkeit von der Scherrate, so nimmt diese mit steigender Scherrate ab (Katritsis et al., 2007). Solche Flüssigkeiten werden auch als Nicht-Newton'sche Flüssigkeiten bezeichnet. Die Proportionalitätskonstante η aus Formel (1.7) ist somit von der Scherrate $\dot{\gamma}$ abhängig wodurch der lineare Zusammenhang aufgehoben und die Berechnung der Scherkraft erschwert wird. Experimentelle Daten haben gezeigt, dass erst bei Scherraten $>50 s^{-1}$ (Pries et al., 1992) bzw. $>100 s^{-1}$ (Katritsis et al., 2007) von einer konstanten dynamischen Viskosität ausgegangen werden kann.

Die Scherkraft Nicht-Newton'scher Flüssigkeiten kann allgemein durch Abänderung von Formel (1.7) als Ostwald de Waele Gleichung beschrieben werden (Papaioannou and Stefanadis, 2005):

$$\tau = \chi \cdot \dot{\gamma}^n \tag{1.8}$$

wobei n und χ Indizes der internen Fluideigenschaften darstellen.

Folgende fluidmechanischen Eigenschaften des Blutes sind besonders erwähnenswert. Da die Erythrozyten den Hauptanteil der korpuskulären Bestandteile bilden sind sie besonders bedeutsam für die rheologischen Eigenschaften des Blutes. Als Maßzahl für den Erythrozytenanteil im Blut verwendet man häufig näherungsweise den Hämatokrit, der

den prozentualen Anteil aller zellulärer Bestandteile im Blut darstellt. Dieser nimmt Einfluss auf die dynamische Viskosität des Blutes (Pries et al., 1992). Die Viskosität des Blutes steigt mit Zunahme des Hämatokrits. Auch dieser Zusammenhang ist nur unter bestimmten Bedingungen als linear zu betrachten und erschwert die Berechnung der dynamischen Viskosität (Pries et al., 1992). Eine weitere Einflussgröße ist die Temperatur des Blutes (Cinar et al., 2001). Experimentelle Daten zeigen einen Anstieg der Viskosität des Blutes um näherungsweise 2% pro °C Temperaturabfall (Barbee, 1973). Auch die Größe des perfundierten Gefäßes nimmt Einfluss auf die Blutviskosität. Dieses Phänomen wurde 1931 von Fahraeus und Lindqvist beschrieben (Fahraeus and Lindqvist, 1931). In Blutgefäßen mit einem Durchmesser $<300\mu\text{m}$ kommt es zur Verlagerung der Erythrozyten in den Axialstrom und zur Ausbildung einer relativ zellarmen Randzone (Busse, 1995). Diese niedervisköse Gleitschicht führt zu einer deutlichen Herabsetzung der scheinbaren Viskosität, v.a. bei Gefäßdurchmessern von $5\text{-}10\mu\text{m}$ (Busse, 1995). Erst ab Gefäßdurchmessern $>1000\mu\text{m}$ bleibt die dynamischen Viskosität konstant (Pries et al., 1992).

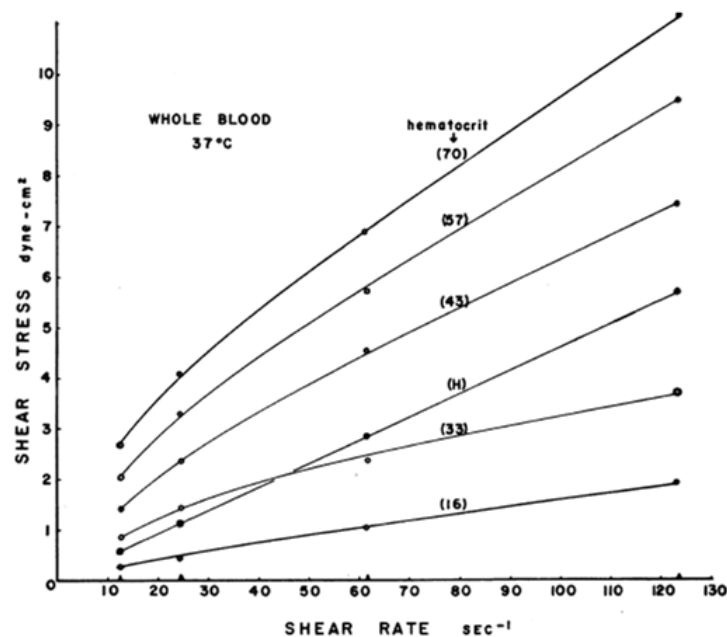


Abbildung 1.6 – Nomogramm zur Bestimmung der Wandscherkraft (aus Wells and Merrill (1962))

Die aufgrund der beschriebenen Eigenschaften schwer zu messende Scherkraft wird deshalb aus praktischen Gründen nur selten zur Beschreibung der Fließeigenschaften des Blutes herangezogen. Häufig bedient man sich stattdessen der Scherrate. Diese Angabe

ist für die Bewertung der auf die Plättchenfunktion Einfluss nehmenden Wandscherkraft sehr ungenau, da die gleiche Scherrate unter Veränderung der oben beschriebenen Einflussgrößen zu unterschiedlichen Scherkräften führt. In den folgenden Flusskammereperimenten wurde die Scherkraft bei definierter Scherrate, definiertem Hämatokrit und definierter Temperatur mittels Nomogramm abgeschätzt (siehe Abbildung 1.6).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Aufbauend auf die einleitend zusammengefasste wissenschaftliche Grundlage werden folgende Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit adressiert:

1. Welche Sphingosinkinaseisoformen sind an der Bildung thrombozytären S1Ps beteiligt?
2. Welche Auswirkung hat das Fehlen der thrombozytären Sphingosinkinasen auf die Plasma-S1P-Homöostase?
3. Welche Rolle spielt die thrombozytäre S1P Bildung für eine adäquate Thrombozytenfunktion *in vitro* und *in vivo*?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendetes Tiermodell

Aufgrund der kostengünstigen Haltung, schnellen Generationszeit und der mit der geringen Größe verbundenen einfachen Handhabung ist die Maus ein attraktiver Modellorganismus der biomedizinischen Forschung. Im Bereich der kardiovaskulären Forschung konnte durch eine Vielzahl verschiedener Mausmodelle ein großer Fortschritt in der Erkenntnis molekularer Prozesse der Thrombose und Hämostase erlangt werden (Ware, 2004). Dennoch muss, trotz einer Vielzahl an Homologien betont werden, dass die Erkenntnisse nicht ohne kritische Betrachtung auf den humanen Organismus übertragen werden dürfen (Tsakiris et al., 1999). Folgende Mausstämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

1. Sphingosinkinase 1/2^{+/+} (BalbC), Wildtypstamm
2. Sphingosinkinase 1^{-/-} (BalbC)
3. Sphingosinkinase 2^{-/-} (BalbC)
4. Sphingosinkinase 1/2^{+/+} (C57BL/6), Wildtypstamm
5. Sphingosinkinase 1^{-/-} (C57BL/6)
6. Sphingosinkinase 2^{-/-} (C57BL/6)
7. NF-E2 ^{+/+} (C57BL/6)
8. NF-E2 ^{-/-} (C57BL/6)

Der BalbC-Stamm ist ein Albinostamm und gehört zu den meist genutzten Inzucht Mausstämmen. Inzuchtstämme erhält man durch mindestens 20 aufeinanderfolgende Geschwisterverpaarungen in einer geschlossenen Kolonie. Man erschafft dadurch einen gut definierten homogenen genetischen Hintergrund, der eine Voraussetzung beständiger und reproduzierbar Ergebnisse darstellt. Aufgrund ihrer guten Zuchteigenschaften und ihrer langen Fruchtbarkeit sind sie in allen Forschungsdisciplinen ein beliebtes Modellsystem. Besonders bekannt wurde der BalbC-Stamm allerdings dafür, dass die Tiere nach Injektion von Mineralöl Plasmozytome entwickeln (Festing, 1998a). Auch beim C57BL/6 - Stamm handelt es sich um einen Inzuchtstamm. Er wurde 1921 von C.C. Little generiert und ist mittlerweile der am häufigsten verwendete Mausstamm zur Generierung genetisch veränderter Tiere (Festing, 1998b).

Die verwendeten Sphingosinkinasedefizienten Mäuse auf BalbC Hintergrund, sowie die dazugehörigen Wiltypkontrolltiere wurden von Zemann et al. 2006 generiert und von Novartis Institutes for Biomedical Research (Basel, Switzerland) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die verwendeten sphingosinkinasedefizienten Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund wurden von Andrea Huwiler am Institut für Pharmakologie der Universität von Bern (Switzerland) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Alle im folgenden beschriebenen Versuche sind von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG in der Fassung vom 25.05 1998) genehmigt.

2.1.1 Zucht

Die Zucht wurde bei allen verwendeten Stämmen in polygamer Verpaarung (Harem-System) durchgeführt, wobei zwei Weibchen zusammen mit einem Männchen in Verpaarung gehalten wurden. Die trächtigen Weibchen wurden einige Tage vor der Geburt von den Männchen getrennt, um ihnen eine stressfreie Geburt zu ermöglichen (Rusch, 2003). Nach vierwöchiger Aufzuchtphase wurden die Weibchen, nach dem Absetzen der Jungtiere erneut verpaart.

2.1.2 Tierhaltung- und Fütterung

Die Tierhaltung erfolgte am Deutschen Herzzentrum München in einer spezifiziert pathogenfreien Haltung. Es wurden je zwei bis sechs Tiere nach Stämmen getrennt in durchsichtigen, leicht reinig- und sterilisierbaren Makrolonkäfigen vom Typ III (360cm²) (Ehret GmbH, Emmendingen) gehalten. Den Tieren standen somit mindestens 2-3 cm³/g Körpermasse zur Verfügung (Rusch, 2003). Als Einstreu wurde entkeimtes, entstaubtes Weichholzgranulat (Tiereinstreu „Faser“, Fa. Altromin, Lage) verwendet, dass sich durch besondere Saugfähigkeit und weiche Beschaffenheit auszeichnet. Dieses wurde zweimal pro Woche gewechselt. Entsprechend der Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (1988) (Rusch, 2003) wurde das „Mikroklima“ in den Käfigen durch ein Belüftungssystem konstant bei einer Temperatur von 20-24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Die Beleuchtungsanlage wurde für die nachtaktiven, stressanfälligen Tiere auf einen geregelten zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus eingestellt. Den Tieren stand zu jeder Zeit ausreichend Leitungswasser und pelletiertes, artgerechtes Futter (Nr.1324 Ratte/Maus-Haltungsdiät 10mm vierkant, Fa. Altromin, Lage) ad libitum zur Verfügung.

2.2 Messung der S1P-Konzentration im Plasma, Thrombozyten und Erythrozyten

Gewinnung der zu testenden Proben Das getestete Plasma wurde durch 15 minütige Zentrifugation von antikoagulierten Vollblut (EDTA K, Monovette, Sarstedt AG&Co, Nürnbrecht, Deutschland) mit 1500 g bei Raumtemperatur und Abnahme des Überstandes gewonnen. Es wurden die Plasmen von SphK1/2^{+/+}, SphK1^{-/-}, SphK2^{-/-}, NF-E2^{-/-} und NF-E2^{-/-} nach Transfusion von Wildtypthrombozyten zum Ausgleich des Thrombozytendefizits gemessen. Die Transfusion erfolgte über Schwanzvenenpunktion und die S1P-Messung wurde 6 h später durchgeführt. Die gewaschenen Thrombozyten wurden wie in Abschnitt 2.7.3 geschildert gewonnen und die Isolation der Erythrozyten erfolgte wie in Abschnitt 2.7.3 dargestellt.

Detektionsmethode Die Konzentration der S1P-Spiegel im Plasma, in Thrombozyten und in Erythrozyten wurde mittels „High-Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) (Fa. Agilent, Palo Alto, CA) und anschließender Massenspektrometrie ermittelt (Zemann et al., 2006). Als interne Kontrolle der Messungen wurde C17-S1P (Avanti Polar Lipids, Alabaster, IL) verwendet. Zuerst wurden die Lipide der Proben mittels Chloroform-/Methanol, bei saurem pH-Wert gefällt. Die gewonnenen Extrakte wurden für 20min bei 40°C in Pyridin mit Acetanhydrid acetyliert (Berdyshev et al., 2005). Nach dem Verdampfen der Lösungsmittel wurden die Proben in Methanol und 0,2%iger Ameisensäure gelöst und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min bei 40°C in eine Eclipse XDB C₈ Säule (5μ, 4,6x150mm; Aligent, Palo Alto, CA) injiziert. Es folgte eine Gradiententrennung, wobei die Konzentration von Eluent B (5mM HCOONH₄+0,1% HCOOH in MeOH/CH₃/H₂O (49/50/1)) gegenüber Eluent A (5mM HCOONH₄ + 0,1% HCOOH in MeOH/CH₃/H₂O (80/20)) im Verlauf von 70 auf 100% gesteigert wurde. Die Detektion erfolgte mittels „Negative Ion Electrosprayionization Liquid Chromatography with Mass Spectroscopy“ (LC-MS/MS) unter Verwendung eines API 4000 QTrap Instruments (MDS Sciex, Concord, Canada) (Berdyshev et al., 2005). Die optimale Kollisionsenergie des derivatisierten S1P war -28V, des C17-S1Ps -26V. Es wurden jeweils die Übergänge im Bereich der Massen-Ladungs-Verhältnisse m/z 462/402 (S1P) und m/z 448/388 (C17-S1P) mittels „Multiple Reaction Monitorings“ (MRM) beobachtet.

Die Bestimmung der S1P-Konzentrationen erfolgte in Kooperation mit Christian Beerli, am Novartis Institutue for Biomedical Research in Basel (Switzerland).

2.3 Messung der SphK-Aktivität von Erythrozyten und Thrombozyten

Sphk-Aktivität in murinen Erythrozyten Die Bestimmung der SphK1- und SphK2-Aktivitäten erfolgte nach der von Olivera et al. publizierten Methode (Olivera et al., 1998). Die Erythrozyten wurden mittels Ficoll-Gradienten aus dem Vollblut isoliert (2.7.3) und jeweils 1×10^8 Zellen in Lysepuffer (20mM Tris, 20% Glycerol, 1mM DTT, 1mM 2-mercaptoethanol, 1mM Natriumorthovanadat, 15mM Natriumfluorid, „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), pH=7,4) aufgenommen. Die Suspension wurde daraufhin zweimal mittels Flüssigstickstoffs

gefroren und wieder aufgetaut. Schließlich wurden die Proben für 30min bei 37°C mit 10µM Sphingosin und [³³P]-γ ATP (0,5 µ Ci, 1mM) in einem Endvolumen von 100 µl Puffer (15 mM MgCl₂, 10 mM NaF und 1,5 mM Semicarbazid) inkubiert. Die markierten Lipide wurden extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie („Thin-Layer-Chromatography“, TLC) (*n*-Butanol:Essigsäure:H₂O, 6:2:2) isoliert (Olivera et al., 1998). Die Quantifizierung des [³³P]-S1P erfolgte mittels Molecular Dynamics Storm Phosphorimager.

SphK-Aktivität in murinen Thrombozyten Die murinen Thrombozyten wurden wie unter 2.7.3 beschrieben isoliert und daraufhin jeweils 1×10^7 Thrombozyten in Tyrodepuffer pH 7,4 (siehe 2.7.3) für 1 h bei 37°C mit ³H-d-erythro-Sphingosin (10µM) und „kaltem“ (= nicht radioaktivem) Sphingosin (10µM) inkubiert. Die Thrombozyten wurden daraufhin mit 0,1 U Thrombin (bovine α Thrombin, Fa. Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) aktiviert, nach 1 bzw. 2 Stunden abzentrifugiert und der Überstand vom Pellet getrennt. Die markierten Lipide wurden extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie („Thin-Layer-Chromatography“, TLC) (s.o.) analysiert. Nach Trocknen der Probe wurde ein Autoradiogramm der Chromatographieplatte angefertigt und die Intensitäten der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen.

Die Sphingosinkinase-Assays wurden in Kooperation mit Nicole Urtz, ehemals Novartis Institute for Biomedical Research, Wien (Österreich) durchgeführt.

2.4 Messung der Arachidonsäure-, Thromboxan B₂-, Prostaglandin E₂- und ATP-Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten

Messung der Arachidonsäurefreisetzung Es wurden jeweils 1×10^7 gewaschene Thrombozyten pro Gruppe (siehe 2.7.3) für 3 Stunden mit 1µCi [³H]-Arachidonsäure inkubiert und daraufhin zweimal mit Tyrodepuffer pH=7,4 gewaschen, resuspendiert und 30min bzw. 60min mit 0,1 U Thrombin (bovine α Thrombin, Fa. Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) stimuliert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände in „High Flash-Point Ultima GoldTM LSC Cocktail“ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aufgenommen und

die Lichtintensität mit Hilfe eines Packard 2000-CA Liquid Scintillation Analyzers gemessen.

Messung der Thromboxan B₂- und Prostaglandin E₂-Freisetzung Die Messung der Thromboxan B₂- und Prostaglandin E₂-Freisetzung erfolgte mittels kommerziell erworbener Enzymgekoppelter Immunadsorptionstests (EIA) Kits (No. 519031 bzw. No. 500141, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Die Thrombozyten wurden gewaschen (siehe 2.7.3) und jeweils 1×10^7 Zellen pro Assay für 0min, 15min, 30min oder 60min mit 0,1 U Thrombin (bovine α Thrombin, Fa. Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) stimuliert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände nach Angaben des Herstellers für den EIA vorbereitet und gemessen.

Messung der ATP-Freisetzung Die ATP-Freisetzung wurde nach Gewinnung der Thrombozytenüberstände (s.o) mittels „ATP Bioluminescence Assay Kit HSII“ (Fa. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) nach dem Protokoll des Herstellers gemessen.

Die Messung der Arachidonsäure-, Thromboxane B₂-, Prostaglandin E₂- und ATP-Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten erfolgte in Kooperation mit Nicole Urtz ehemals am Institut Novartis Institute for Biomedical Research Wien (Österreich).

2.5 Morphologische Analyse der Thrombozyten

Messung des Thrombozytenvolumens Das Thrombozytenvolumen wurde mittels automatischen Zellzählers (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) in jeweils 100 μ l Vollblut bestimmt und die verschiedenen Gruppen untereinander verglichen.

Transmissionselektronenmikroskopie der Thrombozyten Isolierte Thrombozyten (siehe 2.7.3) wurden zuerst mit 3%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylsäurepuffer pH=7,4 bei 4°C für eine Stunde und daraufhin eine weitere Stunde bei 4°C mit 1%igem Osmiumtetroxid (OsO₄) in 0,1 M Cacodylsäurepuffer pH=7,4 fixiert. Nach Fixierung wurden

die Zellen mittels steigender Azetonreihe dehydriert und in Epon fixiert. Für die mikroskopische Analyse der Proben wurden zuerst sogenannte „Semithin Sections“ (ca. $0,5\mu\text{m}$) aus den Gewebelöcken erstellt, mit Toluidinblau gefärbt und mit einem Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Auf den lichtmikroskopischen Beobachtungen basierend wurden aus diesen Blöcken „Ultrathin Sections“ (ca. 80-90 nm) geschnitten, diese mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt und anschließend mit einem Transmissionselektronenmikroskop (CM10, Philips, Zürich, Schweiz) untersucht.

Die elektronenmikroskopische Analyse der Thrombozyten erfolgte in Kooperation mit David Ledieu und Elke Persohn am Novartis Institute for Biomedical Research Basel (Switzerland).

2.6 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Definition der Fluoreszenz

Als Fluoreszenz bezeichnet man die Lichtemission eines Fluorophors, die im Bereich von Nanosekunden nach Lichtabsorption einer typischerweise kürzeren Wellenlänge auftritt (Lichtman and Conchello, 2005). Der Unterschied zwischen der Wellenlänge des anregenden und emittierten Lichts wird als Stokes-Shift bezeichnet und ist die Grundlage der Kontrasterzeugung in der Fluoreszenzmikroskopie. So kann man durch Verwendung entsprechender Filter die Wellenlängen des Anregungslicht für die Detektion durch die Kamera blocken und nur die emittierte Fluoreszenz aufzeichnen. Während des Vorgangs der Fluoreszenz verändert sich das Energieniveau eines Fluorophors in charakteristischer Weise. Sowohl die Effizienz als auch die Absorptions- und Emissionswellenlänge eines Fluorophors ist durch den Energiezustand seiner Valenzelektronen charakterisiert. Bei der Anregung durch elektromagnetische Wellen (z.B. Licht) werden Elektronen aus dem elektronischen Grundzustand in energetisch höher liegende Zustände überführt. Die darauffolgende Relaxation in den energetisch bevorzugten Grundzustand kann nun auf unterschiedlichen Wegen erfolgen und durch das Jablonski-Diagramm veranschaulicht werden (siehe 2.1) (Lichtman and Conchello, 2005).

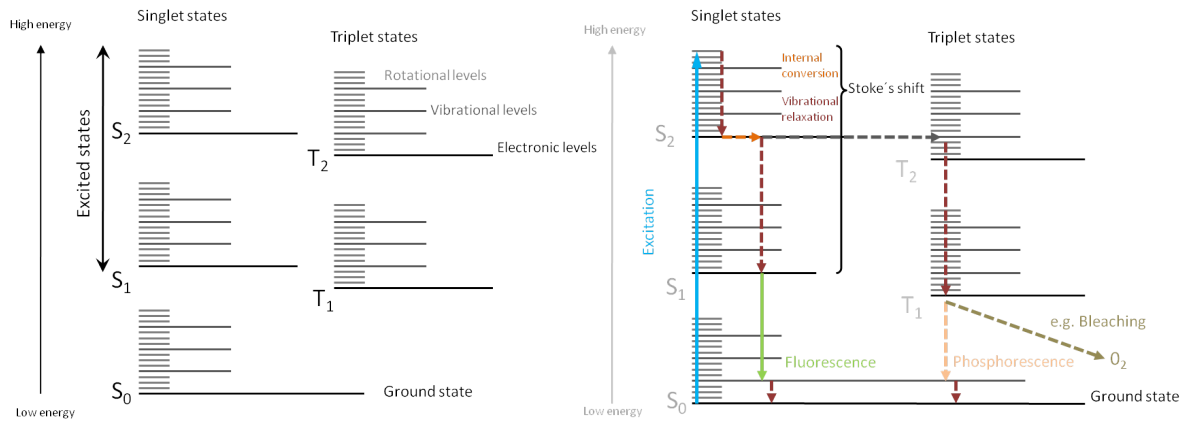


Abbildung 2.1 – Jablonskidiagramm (modifiziert nach Lichtman and Conchello (2005))

S_0 bezeichnet im Jablonski-Diagramm den Grundzustand und entspricht dem Energiezustand eines Moleküls, das noch nicht durch Licht angeregt wurde. S_1 und S_2 sind angeregte Singlet-Zustände, bei denen ein Valenzelektron in weitere Orbitale mit höherem Energieniveau angehoben wurde. Dabei besitzt S_1 ein höheres Energieniveau als S_0 , und S_2 ein höheres als S_1 (siehe Abb. 2.1). Ein in ein höheres Orbital angeregtes Elektron gelangt über verschiedene Mechanismen wieder zurück in den energetisch günstigeren Grundzustand. Zuerst gelangt es über „Internal Conversion“ und „Vibrational Relaxation“ zurück auf das unterste Niveau im S_1 - Zustand. In diesem besitzt das angeregte Molekül nun einen ähnlichen „Vibrational- und Rotational State“ wie im Grundzustand. Durch die in höhere Orbitale gehobenen Valenzelektronen hat es aber immer noch zusätzliche Energie (siehe Abb. 2.1). Gute Fluorophore setzen diese Energie beim Sprung in den präferierten S_0 Grundzustand in Form von Photonen frei. Das Emissionsspektrum eines Fluorophors beinhaltet dabei alle Wellenlängen die die emittierten Photonen besitzen können (siehe grüne bis gelbe Pfeile in Abb. 2.2). Diese Wellenlängen entsprechen dabei der Energiedifferenz zwischen dem untersten Niveau in S_1 und jedem beliebigen Niveau (0-3) in S_0 (siehe Abb. 2.1). Da die Emission vom niedrigsten Niveau des S_1 - Zustands ausgeht ist die Energie der emittierten Photonen typischerweise niedriger als die der Anregenden. Dies ist die Grundlage des Stoke’s Shifts. Auf der rechten Seite des Jablonski-Diagramms in Abbildung 2.1 befinden sich die sogenannten Triplet-Zustände, bei denen die Valenzelektronen sowohl in ein neues Orbital angehoben wurden, als auch ihre Spin-Eigenschaften geändert haben (Lichtman and Conchello, 2005). Den Übergang vom Singlet-Zustand in den Triplet-Zustand bezeichnet man als „Intersystem Crossing“. Er ist in der Quantentheorie nicht erlaubt und besitzt eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit. In der Fluoreszenzmikroskopie ist er dennoch von ent-

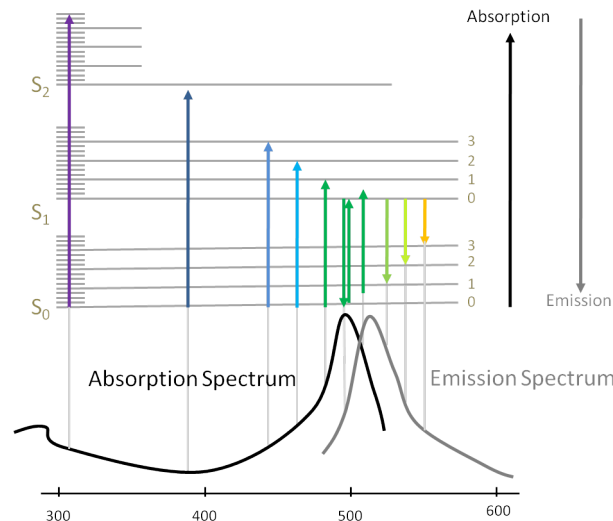


Abbildung 2.2 – Zusammenhang zwischen den Energieniveaus eines Fluorophors und den entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren am Beispiel des Farbstoffs FITC (modifiziert nach Lichtman and Conchello (2005))

scheidender Bedeutung (Lichtman and Conchello, 2005). So müssen Elektronen um in den Singlet-Grundzustand zurück zugelangen erneutes „Intersystem Crossing“ begehen, was aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit dieses Prozesses länger dauert als die reguläre Relaxation. Auch bei diesem Prozess wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Sie wird als Phosphoreszenz bezeichnet und kann durch die zeitlichen Verzögerung in der Fluoreszenzmikroskopie nicht detektiert werden (Lichtman and Conchello, 2005). Von wahrscheinlich noch größerer praktischer Relevanz ist die Tatsache, dass Moleküle im Triplet-Zustand zusätzlich photochemisch reagieren. So führen photochemische Reaktionen unter anderem zur Freisetzung radikaler Sauerstoffspezies, die unerwünschtes „Photobleaching“ und „Phototoxicity“ der gefärbten Zellen verursachen können (siehe Abb. 2.1). Unter „Photobleaching“ versteht man den zunehmenden Verlust der Fluoreszenz im Verlauf der Anregung, „Phototoxicity“ beschreibt den toxischen Effekt der entstehenden Sauerstoffradikale auf den Organismus. Letzteres ist vor allem in der Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen ein limitierender Faktor.

2.6.2 Das Fluoreszenzmikroskop

Um das Phänomen der Fluoreszenz für die Mikroskopie nutzen zu können benötigt man spezielle Fluoreszenzmikroskope, deren essentielle „Hardware“-Bestandteile im Folgen-

den genauer beschrieben werden. Vom Aufbau der Fluoreszenzmikroskope unterscheidet man sogenannte „Inverted“-Mikroskope von sogenannten „Upright“-Mikroskopen, wobei sich die für die Mikroskopie wichtigen Bestandteile lediglich in der Anordnung unterscheiden (siehe Abbildung 2.3). Im „Inverted“-Mikroskop befindet sich das Objektiv unterhalb der Probe. Dieser Aufbau eignet sich besonders für die Mikroskopie von isolierten Zellen, z.B. in der Zellkultur oder für die in Kapitel 2.7 beschriebenen Flusskammerversuche. Im „Upright“-Mikroskop befindet sich das Objektiv über der Probe und der Abstand zwischen der Probenaufgabe und dem Objektiv kann über einen größeren Bereich variiert werden. Dies ist besonders für die in Abschnitt 2.9.3 beschriebene Intravitalmikroskopie wichtig, da man hierbei den Aufbau flexibel an die Größe der verwendeten Maus anpassen muß. Der Strahlengang ist in beiden Aufbauten der selbe. Aus einer Lichtquelle (siehe 2.6.2) wird der gewünschte Anregungswellenlängenbereich durch einen Exzitationsfilter (siehe 2.6.2) gefiltert und über das Objektiv (siehe 2.6.2), welches somit als Kondenser fungiert auf die Probe fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv gesammelt und im Emissionsfilter (siehe 2.6.2) vom Anregungslicht getrennt. Das Fluoreszenzsignal kann schließlich über das Okular mit dem Auge oder über einen Kameraport mit einer Kamera detektiert werden (siehe 2.6.2).

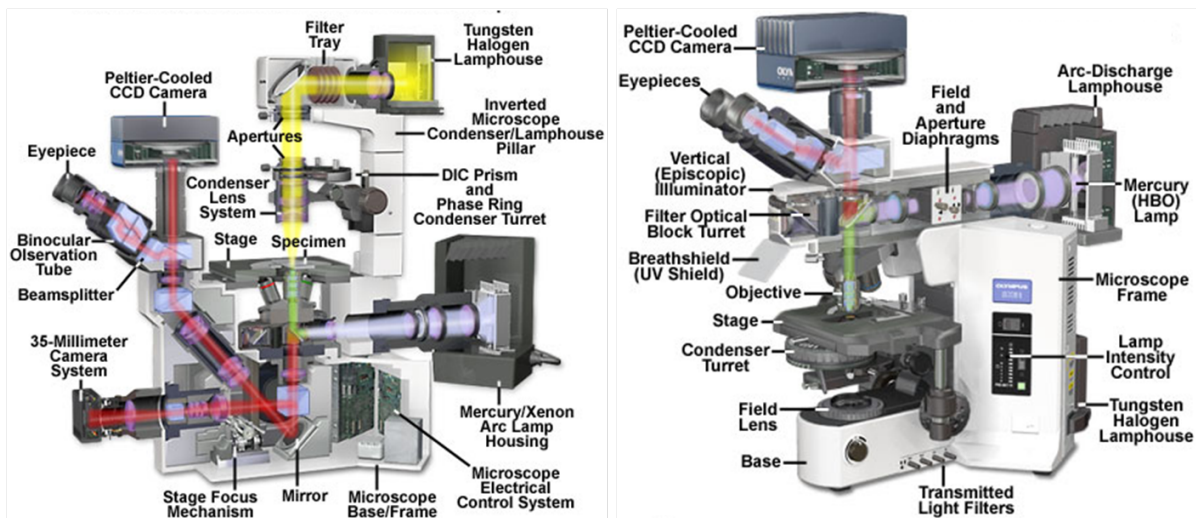


Abbildung 2.3 – Mikroskopdesigns: Das Inverted- und Uprightmikroskop (aus Abramowitz and Davidson (2012))

Die Lichtquelle Die Qualität der Fluoreszenzmikroskopie ist im großen Maße von der Qualität der Lichtquelle abhängig. Wie oben beschrieben besitzt jedes Fluorophor ein bestimmtes Absorptions- und Emissionsspektrum. Um ein Fluorophor effizient anzu-

regen benötigt man also eine Lichtquelle deren Emissionsspektrum möglichst mit dem Absorptionsspektrum des verwendeten Fluorophors übereinstimmt. Gleichzeitig muss die Lichtquelle auch die zur Anregung benötigte hohe Intensität bereitstellen, da man berücksichtigen muss, dass nur ein sehr schmaler Wellenlängenbereich den Anregungsfilter passieren kann (Davidson, 2012). Somit steht nur ein geringer Teil der Gesamtintensität für die Anregung der Probe zur Verfügung. In der Widefield Fluoreszenzmikroskopie wird vor allem die Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe („Mercury Arc-lamp“) verwendet. Quecksilberdampf-Kurzbogenlampen bestehen aus zwei Elektroden, die sich in einem Quarzgehäuse mit vaporisierten elementaren Quecksilber befinden. Die Lampe wird durch hohe Spannungspulse gezündet. Dabei wird ein kleiner Teil des Quecksilbers ionisiert. Nach dem Zünden wird die Spannung reduziert und das ionisierte Gas dient nun der Stromleitung und bildet den Plasmaball der sich zwischen den beiden Elektroden formt. Hierbei entstehen extrem hohe Temperaturen und Drücke innerhalb des Quarzgehäuses, die zu der hohen Lichtintensität führen. Das Emissionsspektrum der Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Man

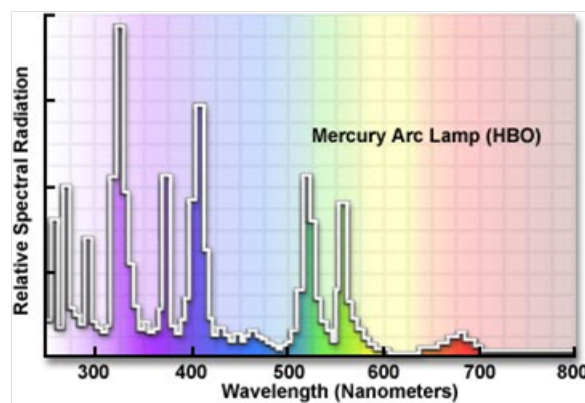


Abbildung 2.4 – Emissionsspektrum der Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (aus Abramowitz and Davidson (2012))

kann deutlich die Intensitätsgipfel im Bereich von 365, 400, 440, 546, und 580 Nanometern im Emissionsspektrum erkennen. Dadurch wird ersichtlich, dass Quecksilberdampf-Kurzbogenlampen nur für die Anregung bestimmter Fluorophore geeignet sind. Ein homogeneres Spektrum bieten hingegen Xenon-Kurzbogenlampen (siehe Abbildung 2.5). Sie ermöglichen die Anregung von Fluorophoren über einen breiten Wellenlängenbereich. Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Plättchenadhäsion unter Flussbedingungen (siehe Abschnitt 2.7.5) wurde eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 50 W/AC L1, Osram, München) verwendet. Für die intravitalmikroskopischen Denuationsversuche (siehe Abschnitt 2.9.3) wurde eine Xenon-Kurzbogenlampe (XBO 150

W/1, Osram, München) verwendet. Zur intratravitalmikroskopischen Analyse der FeCl_3 -Verletzung (siehe Abschnitt 2.10.2) wurde eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 103 W/2, Osram, München) verwendet.

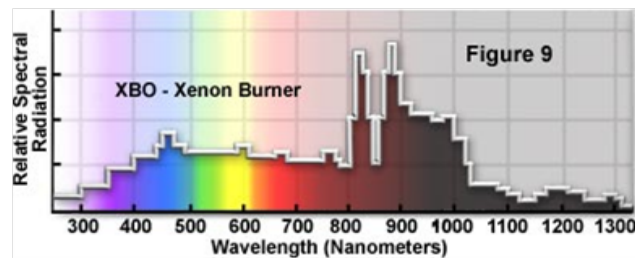


Abbildung 2.5 – Emissionsspektrum der Xenon-Kurzbogenlampe (aus Abramowitz and Davidson (2012))

Die Filtersets Filter sind ein essentieller Bestandteil des Fluoreszenzmikroskops. Sie werden einerseits benötigt um aus dem weißen Licht der Lichtquelle eine bestimmte Wellenlänge für die spezifische Anregung des gewünschten Fluorophors zu filtern. Andererseits sind sie essentiell für die Trennung des emittierten Lichts vom Anregungslicht und ermöglichen somit erst die Detektion des Fluoreszenzsignals. Die wichtigsten drei Filter sind dabei meistens in einem sogenannten „Filtercube“ zusammengefasst. Abbildung 2.6 zeigt schematisch den Aufbau und Strahlengang eines Filtercubes.

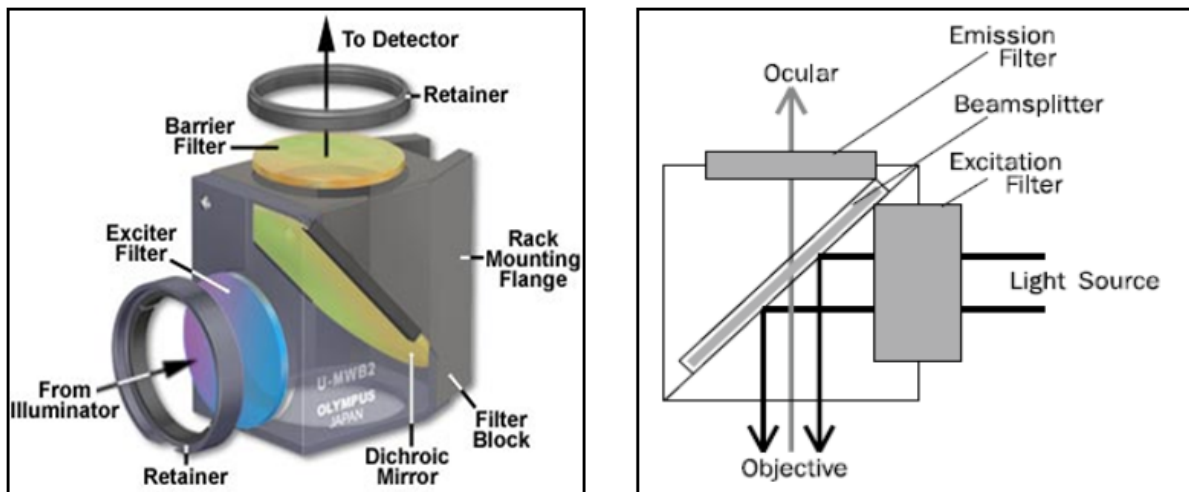


Abbildung 2.6 – Aufbau und Strahlengang eines Filtercubes (aus Davidson (2012) und Reichmann (2010))

Den „Excitation Filter“ passieren nur die Wellenlängen der Lichtquelle, die für die Anregung des verwendeten Fluorophors nötig sind. Um das in unserem Falle verwendete

CFDA-SE anzuregen wurde ein Bandpassfilter zwischen 450-490 nm Wellenlänge verwendet, d.h. unsere Probe wurde mit blauem Licht im schmalen Wellenlängenbereich von 450nm bis 490nm angeregt. Der dazugehörige „Dicroic Mirror“ reflektiert das Anregungslicht in die „Back Focal Aperature“ des Objektivs, welches dadurch auf die Probe fokussiert wird. Das angeregte CFDA-SE emittiert maximal bei 534nm (siehe Abbildung 2.8) im grünen Spektralbereich. Um das im Vergleich zum Anregungslicht deutlich schwächere Fluoreszenzsignal zu detektieren ist eine exakte Trennung dieser Wellenlängenbereiche im Detektionsweg nötig. Dazu besitzt der „Dicroic Mirror“ die Fähigkeit, Wellenlängen die kürzer als 510nm sind, zu reflektieren und Wellenlängen die größer 510nm sind durchzulassen. Dadurch wird das von der Probe unspezifisch reflektierte Anregungslicht geblockt, während das spezifische Fluoreszenzsignal den „Dicroic Mirror“ passiert. Um das Emissionssignal noch exakter von Störsignalen zu befreien, ist im Flitercube des weiteren ein „Emissionfilter“ integriert. Er ist in unserem Falle nur für Wellenlängen, größer als 520nm durchlässig. Das Signal, dass schließlich das Okular oder die CCD-Kamera erreicht ist durch diesen komplexen Filterprozeß spezifisch der Emission der Probe zuzuordnen.

Das Objektiv Das Objektiv ist das wichtigste optische Element eines Mikroskops. Bei optimaler Einstellung des Mikroskops ist es der limitierende Faktor für die Auflösung und Qualität der Aufnahmen. Die optische Auflösung eines Mikroskops ist definiert durch den Abstand zweier Objektdetails, der eine optische Trennung dieser noch zulässt (Inoue, 2006). Ernst Abbe beschrieb den minimalen Abstand (d_{min}) bereits 1873 mit folgender Gleichung (Abbe, 1873):

$$d_{min} = \frac{1.22\lambda_0}{NA_{obj} + NA_{cond}} \quad (2.1)$$

wobei

d_{min}	minimaler Abstand zweier Objektdetails [nm]
λ_0	Wellenlänge des verwendeten Anregungslichts im Vakuum [nm]
NA_{obj}	Numerische Apertur des Objektivs
NA_{cond}	Numerische Apertur des Kondensors

Die numerische Apertur ist eine dimensionslose Zahl, die sich aus dem Produkt des Brechungsindex des Immersionsmediums (Material zwischen Objektiv/Condenser und Fokus) n und dem Sinus des halben objektseitigen Öffnungswinkels α berechnen lässt.

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad (2.2)$$

Aus Formel 2.1 wird ersichtlich, dass eine hohe Auflösung nur durch eine hohe NA möglich wird. Formel 2.2 zeigt, dass bei einem maximalen halben Öffnungswinkel $\alpha = 90^\circ$ und somit $\sin \alpha = 1$ der Brechungsindex des verwendeten Immersionsmediums entscheidend für den Endwert ist. Luft hat einen Brechungsindex von ca. 1, Wasser von ca. 1,33 und Immersionsöl von ca. 1,4. Die maximale NA eines Ölimmersionsobjektivs kann demnach 1,4 betragen. Da in der Fluoreszenzmikroskopie wie in 2.6.2 beschrieben das Objektiv auch als Condenser fungiert gilt für Gleichung 2.1 vereinfacht:

$$d_{min} = \frac{1.22\lambda_0}{2 \cdot NA_{obj}} = \frac{0.61\lambda_0}{NA_{obj}} \quad (2.3)$$

Zum Beispiel könnte man mit dem, in unseren Versuchen verwendeten blauen Anregungslicht der Wellenlänge $488nm$ und dem verwendeten Wasserimmersionsobjektiv, XLUMPlanFI 20x/0,95W (Fa. Olympus, Hamburg) folglich unter optimalen Bedingungen eine maximale Auflösung von ca. 313 nm erzielen. Es ist aber an dieser Stelle zu betonen, dass gerade bei intravitalem Mikroskopie diese optimalen Versuchsbedingungen nicht erreicht werden und als limitierender Faktor die Stabilität der Präparation im Vordergrund steht. In den Flusskammerversuchen wurde ein Zeiss Achroplan 10x/0,25 (Fa. Zeiss AG, Jena) verwendet. Die intravitale Denudationsversuche erfolgten mit Hilfe eines Olympus XLUMPlanFI 20x/0,95W (Fa. Olympus, Hamburg). Zur Darstellung der Thrombusformation nach $FeCl_3$ -Läsion wurde ein Achroplan 20x/0.5W (Fa. Zeiss, Jena) verwendet.

Die Kamera Um die Fluoreszenzbilder aufzuzeichnen benötigt man besonders empfindliche Kameras. In der modernen Fluoreszenzmikroskopie haben sich hierbei sogenannte Charge-Coupled Devices (CCD-Kameras) durchgesetzt. Im Folgenden wird die Funktionsweise einer CCD-Kamera vereinfacht dargestellt. Zur Veranschaulichung dient

hierbei Abbildung 2.7. Ein CCD-Sensor besteht aus in Reihen angeordneten Photodioden. Diese sind meist rechteckig oder quadratisch und bestehen häufig aus dem photosensitiven Material Silizium. Die Größe der einzelnen Photodioden hat Einfluss auf deren Sensitivität und die Auflösung der Aufnahmen. Je größer die Diode, desto lichtempfindlicher ist sie, allerdings nimmt dabei die maximal mögliche Auflösung der Aufnahmen ab. Trifft ein Photon auf eine Photodiode, so gibt dieses seine Energie auf die Elektronen des Diodenmaterials ab, wobei gleichzeitig freie, negativ geladene Elektronen und positiv geladene „Löcher“ entstehen. Die Ladungen werden über eine anliegende Spannung voneinander getrennt und in einer Speicherzelle der Diode gesammelt. Die gespeicherte Ladung ist dabei proportional zu den einfallenden Photonen. Die Ladungen werden seriell in einer sogenannten Eimerkette erst vertikal, dann horizontal ausgelesen. Dadurch wird nacheinander jedem Pixel abhängig von der Ladung ein Wert zugeordnet. Diese Werte entsprechen den Grauwerten unserer Digitalbilder, wobei eine 8-bit Kamera zum Beispiel eine „Dynamic Range“ von $2^8 = 256$ Grauwertstufen besitzt. Eine detaillierte Funktionsbeschreibung der CCD-Kamera findet sich in Pawley 2006. Zur Analyse der Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen *in vitro* wurde eine CCD-Kamera der Fa. Zeiss (AxioCam HRc, Zeiss, Jena) verwendet. Die Denudationsversuche wurden mit einer CCD-Kamera der Fa. Hamamatsu (ORCA-ER Digital Camera, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Ammersee) dokumentiert. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen der FeCl_3 -Läsion erfolgten mit einer CCD Kamera der Fa. Horn Imaging (BC-71, Fa. Horn Imaging, Aalen).

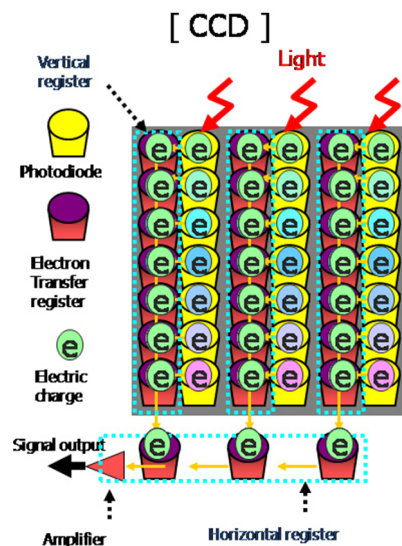


Abbildung 2.7 – Schematische Darstellung eines CCD-Arrays (aus Chuza (2010))

2.6.3 Der Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-Carboxyfluoreszein Diazetat, Succinimidylester (5(6)-CFDA, SE)

Das Xanthen-Derivat 5(6)-Carboxyfluoreszein Diazetat (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) mit der Summenformel $C_{29}H_{19}N_1O_{11}$ ist ein lipophiler, membranpermeabler Farbstoff. CFDA-SE ist selbst farblos und nur minimal fluoreszierend, bevor innerhalb der Zelle durch Esterasen die Azetylgruppen abgespaltet werden (siehe Abbildung 2.8). Der Farbstoff bindet über die Succinimidylestergruppe kovalent an freie Amine zytoplasmatischer Proteine und verbleibt dadurch in der Zelle. Dies ermöglicht eine Langzeitmarkierung von Zellen mit hoher Spezifität des Fluoreszenzsignals (Wang et al., 2005). Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs liegt bei einer Anregungswellenlänge von 514nm, das Emissionsmaximum bei 532 nm (siehe Abbildung 2.8).

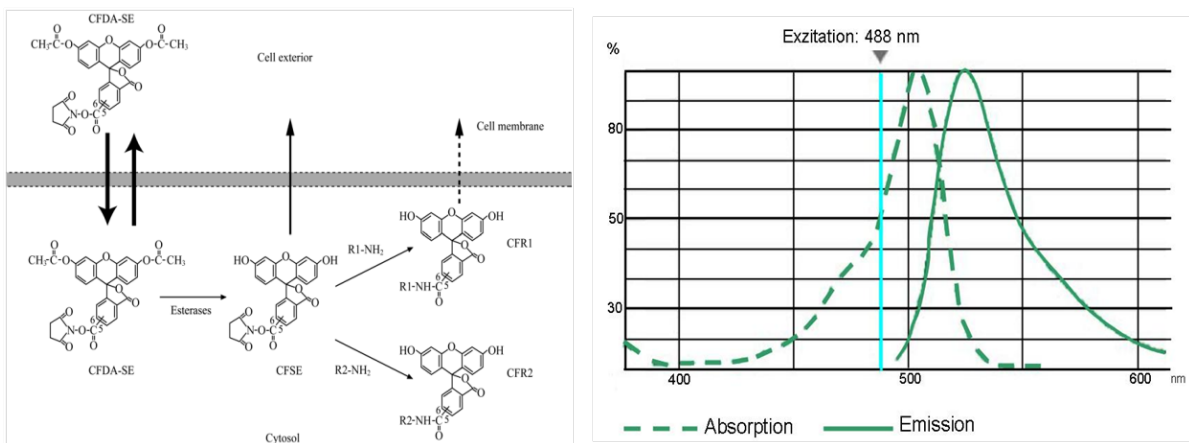


Abbildung 2.8 – Das Fluorophor CFDA-SE. Links ist der molekulare Mechanismus zellulären Aufnahme dargestellt (aus Wang et al. (2005)). Der rechte Teil der Abbildung zeigt das Exzitations- bzw. Emissionsspektrum (aus Invitrogen (2012))

2.7 In vitro-Analyse der Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen

Für die Durchführung eines Flusskammerexperiments benötigt man eine Flusskammer, eine Perfusionspumpe, die den für den Fluß benötigten Druck erzeugt und eine Perfusionslösung. Im Folgenden werden die verwendeten Systeme genauer beschrieben.

2.7.1 Aufbau der Flusskammer

Als Flusskammer wird das kommerziell erwerbliche Ibidi μ -Slide VI (Ibidi GmbH, Martinsried) verwendet (siehe Abbildung 2.9). Es handelt sich hierbei um eine, einmal zu verwendende sogenannte „Parallel-Plate“-Kammer mit sechs perfundierbaren Kanälen. „Parallel-Plate“-Kammern sind in der Regel rechteckige Kanäle deren Böden aus Glascoverslips oder anderen, für die Mikroskopie geeigneten Materialien bestehen. Hierdurch wird eine einfache Darstellung der Zellen ermöglicht (Sakariassen et al., 1983). Ibidi-Slides bestehen aus lichtdurchlässigem Plastik und sind gut für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet. Die einzelnen Kammern sind mit einem Fassungsvermögen von $30\mu\text{l}$ sehr klein (Höhe \times Breite \times Länge = $0,4\text{mm} \times 3,8\text{mm} \times 17\text{mm}$), wodurch die Perfusion geringer Volumina (z.B. Mausblut) mit physiologischen Scherraten über längere Zeit möglich ist (Schulz et al., 2009).

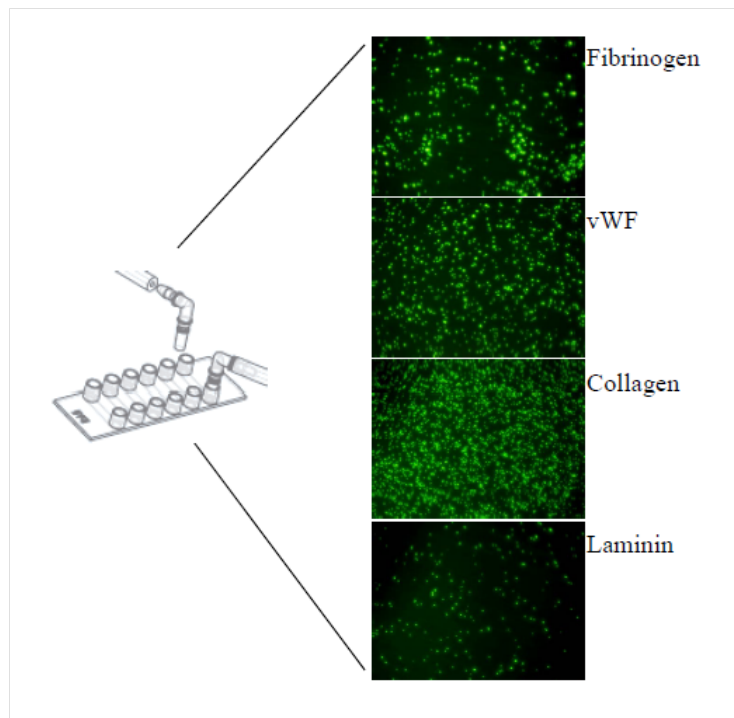


Abbildung 2.9 – Adhäsion CFDA-SE-markierter Thrombozyten auf funktionalisiertem Ibidi-Slide μVI (aus Schulz et al. (2009))

Eine Funktionalisierung der hydrophoben Plastikoberflächen ist durch Beschichtung mit Plasmaproteinen sowie Proteinen der extrazellulären Matrix möglich. Die sterilen Flusskammerslides wurden daher vor Gebrauch mit den in Tabelle 2.1 zusammengefassten Proteinen beschichtet. Die Lösung der kommerziell erworbenen Proteine erfolg-

Protein	Nr./Firma	gelöst in	Endkonzentration	gewaschen mit
Collagen Typ I (rat)	# 354249 BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford	40 μ g/ml	Eisessig	PBS
Laminin (mouse)	# 23017-015 Invitrogen	40 μ g/ml	PBS	A. dest.
Fibrinogen (mouse)	# F4385 Sigma	10 μ g/ml	PBS	PBS
von Willebrand Faktor (human)	# 681300 Calbiochem	40 μ g/ml	A. dest.	A. dest.

Tabelle 2.1 – Funktionalisierung der Flusskammerkanäle

te nach den Angaben der Hersteller. Die optimalen Proteinkonzentrationen wurden in Verdünnungsreihen ermittelt und ihre Funktionalität in Plättchenadhäsionsversuchen getestet (siehe Abbildung 2.9) (Schulz et al., 2009).

Für alle Beschichtungen wurden die Flusskammerkanäle mit 30 μ l der jeweiligen Proteinlösung steril befüllt und anschließend für 40min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde hierbei darauf geachtet keine Luftblasen zu erzeugen, da diese zu inhomogener Kammerbeschichtung führen könnten. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Kanäle mit 200 μ l der zugehörigen Waschlösung vorsichtig gespült. Die Kammern wurden daraufhin bei Raumtemperatur getrocknet und direkt für die Perfusionsversuche verwendet. Beschichtete Flusskammern wurden nicht länger als eine Woche bei 4°C aufbewahrt.

Während den Perfusionen wurden die Flusskammern auf physiologische 37°C erwärmt. Hierfür wurden die Slides auf einer selbst gebauten Heizplatte befestigt.

2.7.2 Funktionsweise der Perfusionspumpe

Eine Perfusionspumpe hat die Aufgabe den erforderlichen Druck zu erzeugen, um die Perfusionslösung mit der vorher definierten Scherrate durch den Flusskammerkanal zu

pumpen. In unseren Versuchen haben wir die rezirkulierende Perfusionspumpe der Firma Ibidi (Ibidi GmbH, Martinsried) verwendet (siehe Abbildung 2.10).

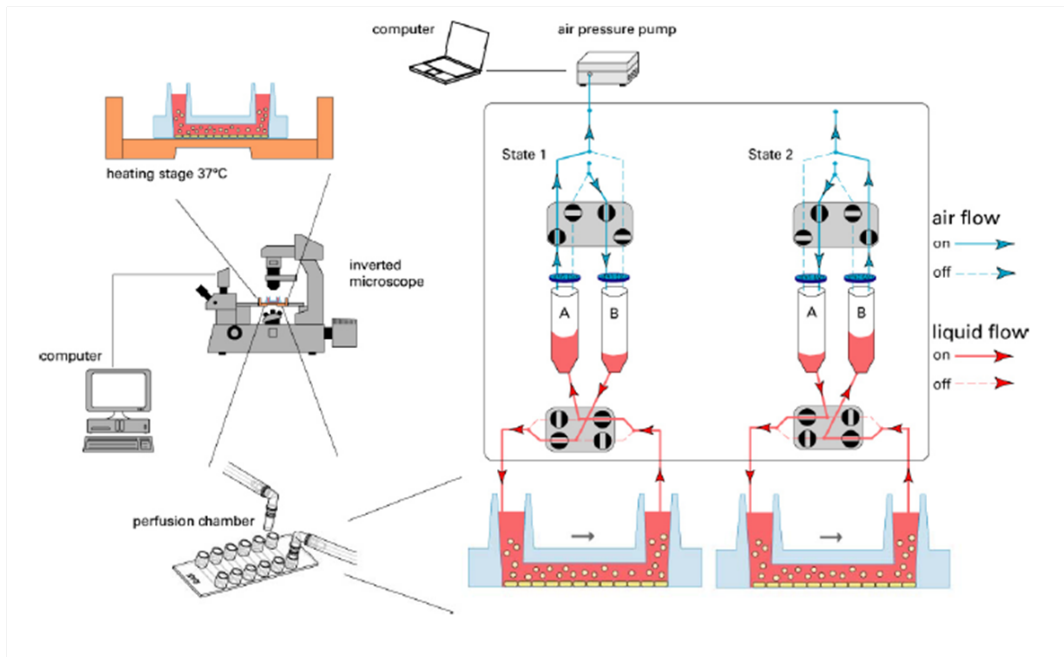


Abbildung 2.10 – Das Ibidi-Perfusionsystem (aus Schulz et al. (2009))

Das computergesteuerte Ibidi-Perfusions-System besteht aus einer Luftdruckpumpe und einem Ventil- und Schlauchsystem, durch das die Flüssigkeit gepumpt wird. Ein rezirkulierendes Perfusionsystem ist ein geschlossener Kreislauf bei dem im Gegensatz zu offenen Systemen das Perfusat nicht verworfen wird, sondern kontinuierlich zirkuliert. Dementsprechend besitzt das System ein Spender (A)- und ein Auffangreservoir (B). Dabei füllt sich das Auffangreservoir im Verlauf eines Perfusionszykluses und steht für den darauffolgenden Zyklus als Spenderreservoir zur Verfügung (*state1* → *state2*). Die Luftdruckpumpe erzeugt einen positiven bzw. negativen Druck in den jeweiligen Reservoirs, wodurch die Flüssigkeit im nachgeschalteten System bewegt wird. Durch diese Art der Fluss erzeugung wird der mechanische Stress, der auf die Zellen einwirkt und diese vorzeitig aktivieren könnte, minimiert. Wären die Flusskammerkanäle direkt an die Reservoirs angeschlossen, so würde sich die Flussrichtung mit jedem Zyklus umkehren. Eine Umkehrung der Direktionalität erzeugt Oszillationen im Flussprofil, die zur unphysiologischen Aktivierung von Blutzellen führen können und für die Untersuchung der Thrombozytenadhäsion im laminaren Fluss nicht geeignet sind. Um diese Problematik zu umgehen hat das Ibisystem einen Ventilmechanismus implementiert, der durch

einen mit der Luftdruckpumpe synchronisierten Schaltmechanismus die Direktionalität in den Flusskammerkanälen aufrecht erhält (siehe Abbildung 2.10 *state1* → *state2*). Wie bereits in Abschnitt 1.3 erwähnt, hängt die Scherrate γ in einem durch Höhe und Breite definierten Flusskammerkanal von der Flussrate Q ab. Die Flussrate wird im Ibidi-Perfusionssystem direkt über den Luftdruck reguliert. Eine Erhöhung des effektiven Druckes führt zu einem proportionalen Anstieg der Flussrate Q . Der Druck kann über die Steuerungssoftware PumpControl 1.3.4 (Ibidi GmbH, Martinsried) reguliert werden (siehe Abbildung 2.11). Nach Kalibrierung des Systems berechnet die Software bei Eingabe der gewünschten Flussrate Q bzw. Scherrate γ den dafür benötigten Druck. Unter Flow Settings (siehe Abbildung 2.11) kann man die hierzu benötigten Parameter einstellen. Wichtig ist hierbei die Berechnung eines Rekalibrierungsfaktors, da sich die Voreinstellung der Software auf die Viskosität von Wasser bezieht. Da Blut eine höhere Viskosität als Wasser besitzt ist ein dementsprechend höherer Druck zur Erzeugung derselben Flussrate Q bzw. Scherrate γ nötig. Man ermittelt den zu berücksichtigenden Rekalibrierungsfaktor (RF) wie folgt: es wird die Dauer $t_{perfusat}$ für die Perfusion von 2 ml der Blutsuspension gemessen und mit der Dauer t_{wasser} einer entsprechenden Perfusion mit 2 ml Wasser verglichen (siehe Formel 2.4).

$$RF = \frac{\frac{2ml}{t_{wasser}}}{\frac{2ml}{t_{perfusat}}} = \frac{t_{perfusat}}{t_{wasser}} \quad (2.4)$$

Ist das System kalibriert und sind die Flussparameter eingestellt, so kann die Perfusion durch Aktivierung des grünen "Play-Buttons" begonnen werden. Die Kalibrierung erfolgte mit der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Perfusionslösung und die Messung ergab einen Rekalibrierungsfaktor von 3,3. Die Scherrate wurde auf 100^{-1} eingestellt. Unter Verwendung in der Einleitung abgebildeten Nomogramms (siehe Abbildung 1.6) entspricht dies bei einem Hämatokrit von 0,35 in etwa einer Scherkraft von 3 dyne/cm².

2.7.3 Erstellung der Perfusionslösung

Erstellung des modifizierten Tyrodes-Puffers Um ein weitgehend physiologisches Milieu während und nach der Thrombozytenisolation zu gewährleisten wurde ein auf HEPES basierender, modifizierter Tyrodes-Puffer hergestellt. HEPES wird für biochemische, molekularbiologische und mikrobiologische Zwecke häufig als Puffersubstanz ver-

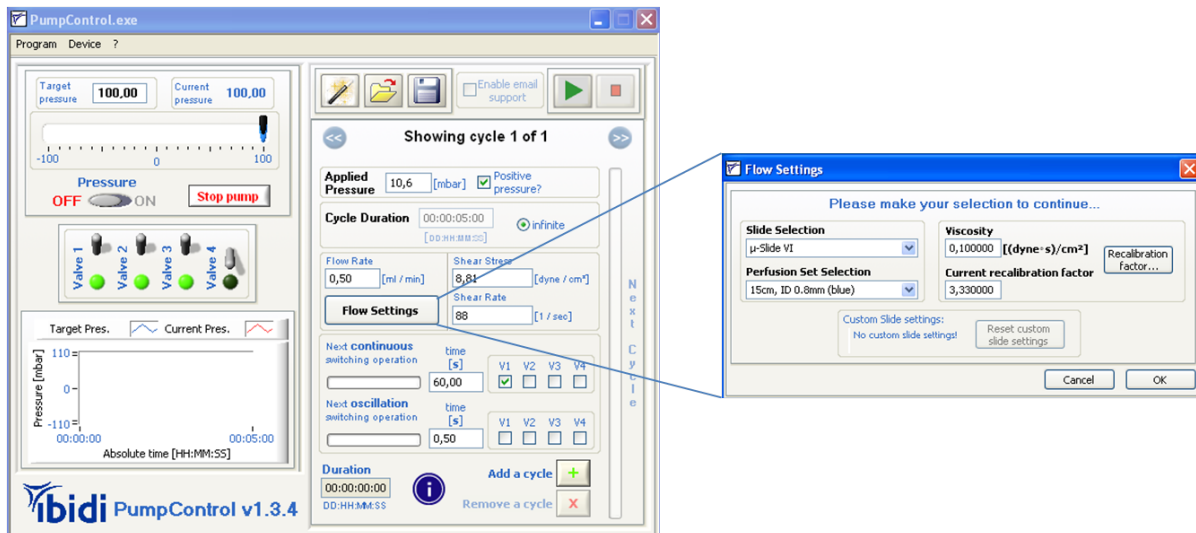


Abbildung 2.11 – Die Steuerungssoftware PumpControl

wendet, da es bei einer Säurekonstante von $pK_s = 7,55$ (bei 20°C) eine gute Pufferkapazität zwischen $pH = 6,8 - 8,2$ besitzt und (Good et al., 1966).

Die 10fach-konzentrierte Tyrodes-Stocklösung (1000ml Aqua bidest, 80g NaCl (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt), 10,15g NaHCO_3 (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt) und 1,95g KCl (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt)) wurde 1 : 10 mit aqua destillata verdünnt und fettsäurefreies BSA [0,1%] (Bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) sowie D(+)-Glucose [0,1%] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) darin gelöst. Nach Zugabe der HEPES Lösung [10mM] wurde die Pufferlösung unter Zugabe von 2M HCl auf einen pH-Wert von 6,5 bzw. 7,4 titriert.

Isolation und Färbung muriner Thrombozyten Die Gewinnung des murinem Vollblutes erfolgte durch Punktion am schlagenden Herzen. Hierzu wurde eine Inhalationsanästhesie mittels Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) (Verdampfer Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickemeyer, Tuttlingen eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) und Sauerstoff durchgeführt. Um Schmerzfreiheit zu erzielen wurde zusätzlich Fentanyl s.c. verabreicht (Fentanyl-Curamed, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe). Die erwünschte Narkosetiefe wurde dabei durch Ausbleiben des Schmerzreflexes bei starkem Druck auf die digitale Nagelfalz bestimmt. Der in Rückenlage befindlichen Maus wurde in einem ca. 1 cm langen Hautschnitt oberhalb des

Sternums der Thorax frei präpariert und eine sterile Blutabnahme ermöglicht. Mittels einer 26G 1/2"-Kanüle ($0,45\text{mm} \times 13\text{mm}$) (Microlance 3, Becton Dickinson, Heidelberg) wurde das schlagende Herz links-parasternal, transthorakal punktiert. Es wurden 1ml Vollblut pro Maus entnommen. Da die Herzpunktion mit einem hohen Risiko sehr schmerzhafter Komplikationen, wie Pneumothorax oder Herzbeuteltamponade einhergeht, wurden die Mäuse nach der Punktion mittels kranio-cervikaler Dislokation euthanisiert (Hau and Van Hoosier, 1994).

Die Abnahme des Blutes erfolgte in eine mit Antikoagulanzen benetzte 2ml Spritze. Als Antikoagulanzen wurden 140 μl Acid-Citrate-Dextrose (ACD) verwendet. ACD ist in Aqua destillata gelöstes Na_3 -Zitrat [85mM] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), Citronensäure [64,9mM] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und Glucose [111mM] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Es besitzt einen pH-Wert von 4,69. Der resultierende niedrige pH-Wert des antikoagulierten Blutes ($\text{pH} \approx 6,2$), hemmt die Thrombozytenaktivierung ergänzend zur kalziumbindenden Wirkung des Zitrats. Es eignet sich deshalb sehr gut zur Isolation gewaschener Thrombozyten, da die hierfür notwendigen Zentrifugationskräfte ein großes Risiko für die mechanische Aktivierung der Plättchen darstellen (Jennings and McCabe White, 2007). Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass das nachfolgend beschriebene Protokoll zur Thrombozytenisolation und 5(6)-CFDA-Färbung zu keiner relevanten Thrombozytenaktivierung führt (Massberg et al., 1998; Baker et al., 1997).

Zuerst wurde das antikoagulierte Vollblut 1:1 mit modifizierten Tyrodes-Puffer $\text{pH} = 6,5$ verdünnt und daraufhin das plättchenreiche Plasma (PRP) isoliert. Hierzu wurde die Vollblutsuspension für 20min bei 92g (Heraeus, Megafuge, Hanau) zentrifugiert. Zum Stoppen der Zentrifugation wurde keine Bremse verwendet, um die beim Abbremsen entstehenden Verwirbelungen an der Separationsgrenze zu vermeiden. Das PRP befindet sich nun im Überstand und wurde vorsichtig abpipettiert. Es folgte die Färbung des PRP mit dem unter Abschnitt 2.6.3 genauer beschriebenen Fluoreszenzfarbstoff 5(6)-CFDA (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Der Farbstoff wurde direkt zum PRP hinzupipettiert [22,4 μM] und das Gemisch für 2min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1277g für 10min mit eingeschalteter Bremse. Die pelletierten, gefärbten Thrombozyten wurden vorsichtig in 250 μl Tyrodes-Puffer $\text{pH} = 7,4$ resuspendiert und bis zum Versuchsbeginn lichtgeschützt aufbewahrt. Die genaue Zahl der gewaschenen Thrombozyten in der Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Zellzählers (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Nor-

derstedt) automatisch bestimmt.

Isolation humaner Erythrozyten In einem 50ml Falcon (BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford) wurden 17ml antikoaguliertes humanes Vollblut (CPDA,S-Monovette, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) vorsichtig auf die gleiche Menge Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Europe GmbH, München) pipettiert. Das Vollblut besitzt eine geringere Dichte als Ficoll-PaqueTM PLUS, vermischt sich mit diesem deshalb nicht und bildet die scharf abgrenzbare obere Schicht in Abbildung 2.12.

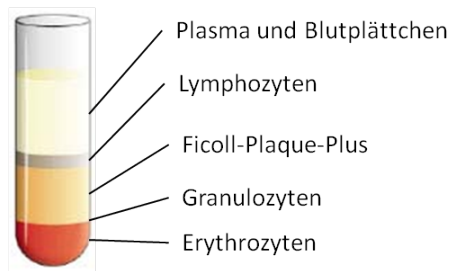


Abbildung 2.12 – Zellfraktionen nach Auftrennung des Vollblutes durch Ficoll-Plaque-Plus Gradientenzentrifugation

Der Ansatz wurde nun bei 600g für 16min mit ausgeschalteter Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden die verschiedenen Blutzellen voneinander separiert und in unterschiedlichen Schichten unter- bzw. oberhalb des Separationsmediums angereichert (siehe Abbildung 2.12). Erythrozyten, die bei der Zentrifugation mit Ficoll-PaqueTM PLUS in Kontakt kommen aggregieren durch diese Substanz (reversibel) und sedimentieren deshalb besonders schnell. Man findet sie nach Zentrifugation am Boden des Falcons. Direkt darüber befinden sich Granulozyten deren Dichte bei Kontakt mit der leicht hypertonen Ficoll-PaqueTM PLUS Lösung leicht zunimmt. Lymphozyten, Monozyten und Blutplättchen haben eine geringere Dichte als Ficoll-PaqueTM PLUS und befinden sich deshalb zusammen mit dem Blutplasma in unterschiedlichen Schichten im Überstand (Böyum, 1968). Zur Isolation der Erythrozyten wurden demzufolge alle darüberliegenden Schichten abpipettiert und anschließend die Aufreinigung und der Hämatokrit der Erythrozytensuspension mit dem Zellzählgerät (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) überprüft.

Zusammensetzung der Perfusionslösung Vor jeder Perfusion wurden 3ml Perfusionslösung frisch hergestellt. Dabei wurden die isolierten humanen Erythrozyten mit

dem modifizierten Tyrodes-Puffer ($pH = 7,4$) auf einen Hämatokrit von 0,35 eingestellt. Diese Suspension wurde mit $CaCl_2$ [1mM] und $MgCl_2$ [1mM] angereichert, da sowohl Kalzium als auch Magnesium für die optimale Thrombozytenfunktion unerlässlich sind (Whiss and Andersson, 2002). Unmittelbar vor Perfusionsbeginn werden $3 \times 10^3/ml$ der isolierten Mausthrombozyten hinzu pipettiert.

2.7.4 Durchführung der Perfusion

Jeweils 3 proteinbeschichtete Flusskammerkanäle wurden gleichzeitig mit der beschriebenen Perfusionslösung perfundiert. Nach jeweils fünf Minuten der Perfusion wurde die Plättchenadhäsion mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Es wurden hierzu jeweils drei Mikrographien pro Kammer, an definierten Stellen und immer in derselben Reihenfolge erstellt, um einem systematischen Fehler vorzubeugen (siehe Abbildung 2.13).

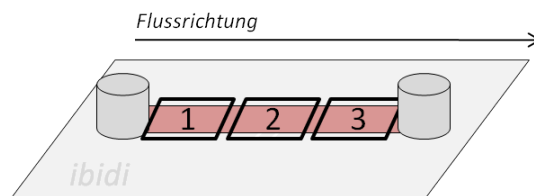


Abbildung 2.13 – Dokumentationsschema der Thrombozytenadhäsion in der Ibdiflusskammer

2.7.5 Quantifizierung der Daten

Die Quantifizierung der Daten erfolgte durch die Messung der Fläche der adhärenen Thrombozyten in einem Fluoreszenzbild. Ein digitales Photo ist ein xy-Gitter (Raster), das sich aus mehreren gleichgroßen Bildelementen (picture element=Pixel) zusammensetzt. Jedem Pixel ist ein Intensitätswert zugeordnet. Eine 8-bit Kamera ermöglicht z.B. eine Erkennung von 2^8 Grauwertstufen (Dynamic Range), d.h. dem Minimum ist der Wert 0 zugeordnet, dem Maximum der Wert 255 (Amos, 2000). Als Kontrast bezeichnet man den Unterschied zwischen hellen und dunklen Bereichen eines Bildes. Im Falle einer 8bit Kamera hat er sein Maximum zwischen den Werten 0 und 255. In der

Fluoreszenzmikroskopie erzielt man einen Kontrast, in dem unter optimalen Bedingungen nur das Fluorophor bzw. die durch das Fluorophor markierte Struktur bei einer bestimmten Anregungswellenlänge ein Fluoreszenzsignal emittiert. Diese Bereiche besitzen hohe Grauwerte. Der Hintergrund, also fluorophorfrem Bereiche sind unter optimalen Bedingungen signalfrei und haben den minimalen Grauwert. Dies kommt in biologischen Proben selten vor. Viele biologische Proben, sowie Substanzen die zur Präparation dieser benötigt werden besitzen Autofluoreszenz und führen zu unspezifischen Signalen. Auch Fluoreszenzmarker sind häufig nicht 100%ig spezifisch und stabil. So können Sie z.B. unspezifische Bindungen eingehen oder degradiert werden (Lichtman and Conchello, 2005). Außerdem besteht die Gefahr des sogenannten Photobleachings, was dazu führt, dass fluorophormarkierte Strukturen bei längerer, hochenergetischer Anregung an Intensität verlieren und damit auch der Kontrast zum unspezifischen Hintergrund geringer wird (Lichtman and Conchello, 2005). Zahlreiche Gründe können also dazu führen, dass die Grauwerte von spezifischem Signal und Hintergrund („Signal to Noise“) nahe beieinander liegen und der Kontrast nicht dem Optimalfall entspricht (Amos, 2000). Um in der automatisierten Analyse von Fluoreszenzmikrographien zwischen spezifischem und unspezifischem Signal zu unterscheiden definiert man sogenannte Grauwertschwellen (Thresholds). Werte, die über diesen definierten Schwellen liegen werden von der verwendeten Software als spezifisch gewertet und in die Messung mit einbezogen. Die Bildanalyse-Software CapImage (Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) misst die Fläche der fluoreszierenden adhärenen Thrombozyten indem es alle Pixel addiert, die über der vom Benutzer definierten Grauwertschwelle liegen (siehe rote Markierung in Abbildung 2.14).

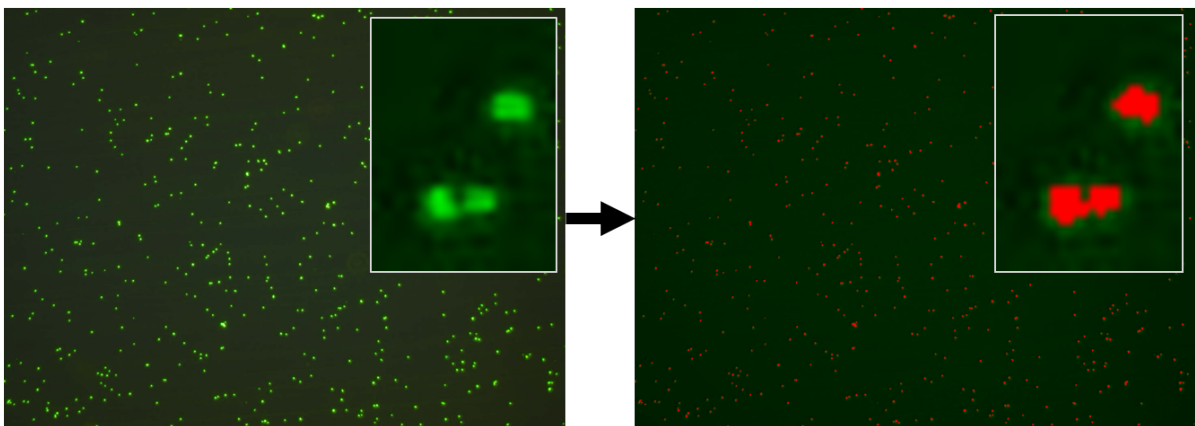


Abbildung 2.14 – Bestimmung der Grauwertschwelle zur Quantifizierung adhärenen Thrombozyten nach Flusskammerperfusion

Jedem Pixel ist in Abhängigkeit der verwendeten Vergrößerung eine bestimmte Höhe und Breite in μm zugeordnet. Dadurch lässt sich die Fläche, der in die Auswertung einbezogenen Pixel und damit auch der fluoreszierenden Thrombozyten wie folgt berechnen:

$$A_{Thrombozyten} = n_{Pixel} \times b_{Pixel} \times h_{Pixel} \quad (2.5)$$

wobei

$A_{Thrombozyten}$	Fläche der adhärennten, fluoreszierenden Thrombozyten in [μm^2]
n_{Pixel}	Anzahl der fluoreszierenden Pixel
b_{Pixel}	Pixelbreite in [μm]
h_{Pixel}	Pixelhöhe in [μm]

Auf diese Weise werden pro Kammer drei Mikrographien ausgewertet und der Mittelwert dieser gebildet.

2.8 Untersuchung der Thrombozytenaggregation im Vollblutaggregometer

2.8.1 Messprinzip und Aufbau des Multiplate Systems

Die Messung der Thrombozytenaggregation im Vollblut wurde an einem Multiplate Aggregometer durchgeführt. Diese Methode basiert auf der sogenannten Impedanzaggregometrie, einer Methode der Plättchenfunktionsmessung die erstmals 1979 beschrieben wurde (Cardinal and Flower, 1979a,b). In ein, mit antikoaguliertem Vollblut oder plättchenreichem Plasma (PRP) gefülltes Messgefäß tauchen zwei Platinelektroden, an die eine definierte Ausgangsspannung angelegt ist. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Elektroden konnten zeigen, dass es in diesem Ausgangszustand zur Anlagerung einer Monoschicht adhärennten Blutplättchen kommt (Cardinal and Flower, 1979a). Durch

Messung der Stromstärke kann nun über das Ohm'sche Gesetz ($R = \frac{U}{I}$) der Ausgangswiderstand errechnet werden. Da an den Elektroden eine Wechselspannung anliegt, spricht man von der Impedanz als physikalisches Maß des Wechselstromwiderstands. Induziert man nun durch Zugabe bestimmter Thrombozytenrezeptoragonisten die Aktivierung der Blutplättchen, so können diese miteinander interagieren und lagern sich als Aggregate an die ursprüngliche Monoschicht an (siehe Abbildung 2.15) (Sibbing et al., 2008). Dabei

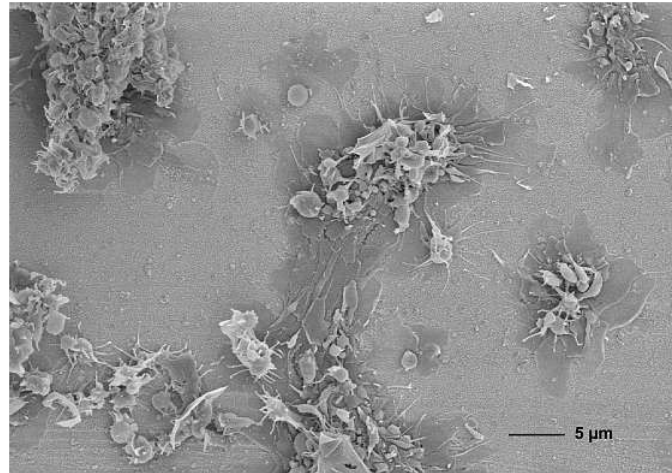


Abbildung 2.15 – Elektronenmikroskopische Darstellung der Thrombozytenaggregation in der Impedanzaggregometrie (2000fache Vergrößerung)(aus Sibbing et al. (2008))

ändert sich die Leitfähigkeit zwischen den beiden Elektroden wodurch der Stromfluss abnimmt und die Impedanz zunimmt. Diese Impedanzzunahme korreliert mit dem Ausmaß der Plättchenadhäsion bzw. -aggregation. Das verwendete Multiplate System (Multiplate, Verum Diagnostica GmbH, München) besitzt dabei einen besonderen Aufbau. Abbildung 2.16 zeigt eine schematische Darstellung einer Messzelle. Das Fassungsvermögen einer Mini-Messzelle (MP0023, Verum Diagnostica GmbH, München) ist $300\mu\text{l}$ und erlaubt somit auch die Mehrfachmessung geringer Mengen Mausblutes. Pro Versuchseinheit tauchen vier leitfähige, silberummantelte Kupferelektroden in die Probe ein, wobei jeweils zwei Drähte eine unabhängige Sensoreinheit bilden. Somit können pro Versuch zwei Messungen einer Probe mit interner Kontrolle durchgeführt und die Sicherheit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens verbessert werden (Multiplate, 2008). Am Boden jeder Messzelle befindet sich ein Poly-tetra-fluoro-ethylene-beschichteter Rührfisch der mit 800 U/min rotiert. Er ermöglicht einerseits die gleichmäßige Verteilung der applizierten Thrombozytenrezeptoragonisten und imitiert andererseits einen, wenn auch sehr langsamen Blutfluss. Die Messzellen lassen sich nicht reinigen und es wurde für jeden Versuch eine neue Messzelle verwendet. Das Multiplate System besitzt fünf Kanäle, wodurch fünf

Proben gleichzeitig gemessen werden können.

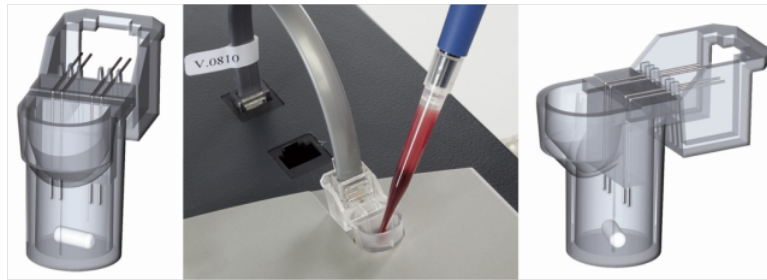


Abbildung 2.16 – Schematischer Aufbau einer Multiplate Messzelle (aus Multiplate (2008))

Die Impedanz als Messgröße des Einflusses der Plättchenadhäsion und -aggregation auf den Stromfluss über die Elektroden wird in der Software des Multiplate Systems in arbiträren „Aggregation Units“ (AU) angegeben. Die graphische Darstellung auf dem Display zeigt die Aggregation in AU im zeitlichen Verlauf an (siehe Abbildung 2.17). Folgende Werte lassen sich aus der graphischen Darstellung ableiten. Die maximale Aggregation ist durch den maximalen Ausschlag in y- Richtung repräsentiert. Die Aggregationsgeschwindigkeit entspricht der Steigung der Kurve, also der Tangente an der Kurve zu einem bestimmten Zeitpunkt auf der x-Achse. Der wichtigste Parameter ist die sogenannte „Area Under the Curve“ (AUC) mit der arbiträren Einheit AU*min. Man erhält sie aus dem Integral der Kurve und ihre Größe ist einerseits Abhängig von der maximalen Aggregation (Höhe der Kurve), andererseits von der Geschwindigkeit der Aggregation (Steigung der Kurve). Dieser Wert ist dadurch am besten geeignet das Ausmaß der Plättchenaktivität umfassend zu beschreiben und wird deshalb als Testparameter verwendet. Es werden jeweils beide parallel laufenden Messungen einer Testzelle auf dem Display angezeigt. Die dargestellten Parameter entsprechen dabei dem Mittelwert der Einzelmessungen. Zusätzlich errechnet das Gerät zur internen Kontrolle automatisch den Pearson Korrelationskoeffizienten. Unterschreitet dieser den Wert von 0,98, so fordert die Software zu einer Wiederholung des Versuchs auf. Außerdem werden die AUC-Werte der beiden Einzelmessungen einer Testzelle verglichen und bei einer Abweichung von > 20% eine Fehlermeldung generiert.

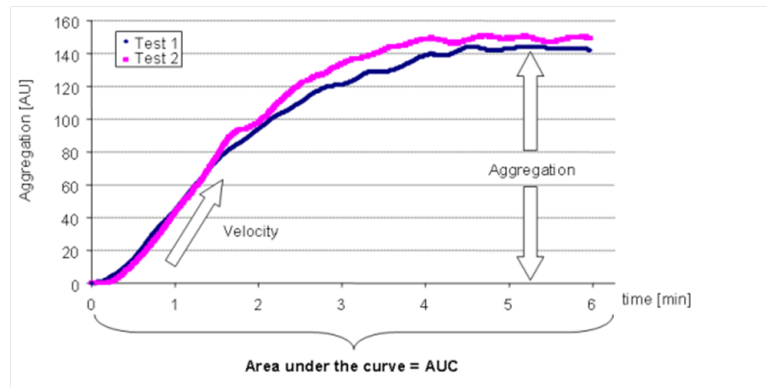


Abbildung 2.17 – Dokumentation der Aggregation durch die Multiplatesoftware (aus Multiplate (2008))

2.8.2 Präparation des murinen Vollblutes und Versuchsablauf

Die Blutentnahme erfolgte kardial, wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben. Das Vollblut wurde mittels $25\mu\text{g}/\text{ml}$ Lepirudin (Refludan, Celgene Europe, Windsor, Großbritannien) antikoaguliert und vor der Messung mit 0,9%igen Kochsalzlösung im Verhältniss 1:2 verdünnt. Vor dem Starten der Aggregation durch die Zugabe der entsprechenden Aktivatoren, wurde die Suspension 3min bei 37°C unter kontinuierlichen Rühren in der Testzelle belassen. Durch die angelegte Spannung kommt es zur Bildung einer Thrombozytenmonoschicht auf den Meßelektroden, womit der Ausgangszustand der eigentlichen Messung erreicht ist. Es wurden nun entweder $1,2\mu\text{g}/\text{ml}$ fibrilläres Kollagen (COLtest, Verum Diagnostica GmbH, München) oder $7\mu\text{M}$ Adenosindiphosphate (ADPtest, Verum Diagnostica GmbH, München) in den Versuchsanzatz pipettiert und die darauffolgende Aggregation für weitere fünf Minuten gemessen. Je nach vorhandener Blutmenge wurde der Versuch ein bis dreimal pro Versuchstier durchgeführt und die AUC-Mittelwerte dokumentiert.

2.9 In vivo-Analyse der Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen

Um die Beteiligung der Sphingosinkinasen auf die Plättchenadhäsion und Thrombusformation im lebenden Organismus zu untersuchen wurde die von Lindner et al. publizierte

Methode der Endothelenuktion verwendet (Lindner et al., 1993). Diese mechanisch induzierte Endothelläsion wurde daraufhin mittels Fluoreszenzmikroskopie intravitalmikroskopisch analysiert. Im Folgenden wird der Versuchsaufbau detailliert beschrieben.

2.9.1 Wahl und Durchführung der Narkose

Bei der Gewebeentnahme zur Genotypisierung der Tiere und im Rahmen der intrakardialen Blutentnahme durch Herzpunktion (Finalversuch) (siehe 2.7.3) wurde eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) durchgeführt. Zusätzlich erfolgte im Falle der intrakardialen Blutabnahme die subkutane Gabe eines Analgetikums (Fentanyl-Curamed, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe). Die Narkose bei operativen Eingriffen zur intravitalen Mikroskopie wurden durch Inhalationsanästhesie eingeleitet und mittels Injektionsanästhesie aufrechterhalten. Zur Inhalationsanästhesie wurde Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich) über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) mit Sauerstoff vermischt und das Gasgemisch über eine Beatmungsmaske der Maus zugeführt. Aufgrund des schnellen An- und Abflutens des Narkosegases eignet sich diese Inhalationsanästhesie besonders gut für kurz dauernde Eingriffe. Isofluran besitzt eine schwache analgetische Wirkung und reicht um leichte Schmerzen auszuschalten, so dass auf ein zusätzliches Analgetikum verzichtet werden kann. Die Durchführung größerer Operationen bedarf einer zusätzlichen Injektionsanästhesie. Die Narkose soll einen Zustand der eingeschränkten Empfindung und psychischen Dämpfung (Sedation), der Bewusstlosigkeit (Hypnose), der Schmerzfreiheit (Analgesie) und der Muskeler schlaffung (Relaxation) erzeugen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist kein Medikament bekannt, welches alle der genannten Kriterien erfüllt und weshalb auf eine Kombination mehrerer Pharmaka zurückgegriffen wurde. Es wurde eine Kombination aus Fentanyl, Medetomidin und Midazolam verwendet.

Fentanyl ist ein stark wirksames Opiat (ca. 100 mal potenter als Morphin), mit sehr guter analgetischer und leicht atemdepressiver Wirkung. Der α_2 -Adrenorezeptoragonist Medetomidin wirkt sedativ, hypnotisch und analgetisch, und sollte aufgrund seiner atemdepressiven und arrhythmogenen Nebenwirkungen nur in möglichst geringen Dosierungen eingesetzt werden. Das atemdepressiv wirkende Benzodiazepin Midazolam dient als Sedativum, Muskelrelaxanz und zur Krampfhemmung. Neben der Abdeckung der

zur Narkose geforderten Kriterien ermöglicht diese Kombinationstherapie eine Dosisreduktion der Einzelsubstanzen im Vergleich zur Monotherapie. Dadurch werden die genannten Nebenwirkungen stark reduziert. Die Applikation der Substanzen erfolgte intraperitoneal, wobei 5,0 mg/kg Midazolam (Midazolam-ratiopharm, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 0,5 mg/kg Medetomidin (Dormitor, Pfizer GmbH, Karlsruhe) und 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Curamed, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) verabreicht wurden (Massberg et al., 2002). Die Narkose wurde in regelmäßigen Abständen mittels Atemfrequenz- und Atemtypkontrolle überwacht. Die Narkosetiefe wurde durch das Fehlen des Zwischenzehenreflexes der Beine überprüft. Die Mäuse wurden über eine Maske mit Sauerstoff beatmet. Um Hypothermien zu vermeiden wurde eine Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner, München) verwendet.

Die Dauer eines operativer Eingriffs betrug in allen Versuchsgruppen etwa 1,5 bis 2 Stunden. Danach wurde das Tier in tiefer Narkose durch craniocervikale Dislokation getötet (Close et al., 1997).

2.9.2 Operationstechnik

Alle nachfolgend beschriebenen Operationsschritte wurden in tiefer Narkose (siehe Abschnitt 2.9.1) durchgeführt. Um das Austrocknen der Cornea zu verhindern wurden die Augen mit Bepanthen-Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) geschützt. Nach erneuter Prüfung der Narkosetiefe wurde das Tier in Rückenlage auf einer Wärmematte mittels Klebeband (Transpore, 3M Health Care, Neuss) fixiert. Dabei wurde die Nase in einer Atemmaske fixiert und diese mit einem Luft/Sauerstoffgemisch begast. Es folgte die Enthaarung der Operationsstelle mittels Enthaarungscreme (Pilca extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Brühl) und daraufhin die alkoholische Desinfektion und Entfettung der Haut (Cutasept, Fa. Bode Chemie, Hamburg). Die Operation erfolgte mikrochirurgisch unter Verwendung einer Stereolupe (Stemi-2000-C, Fa. Zeiss, Göttingen) wobei die Ausleuchtung des Operationfeldes mittels Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Fa. Zeiss, Göttingen) erfolgte.

Applikation fluoreszenzmarkierter Thrombozyten über einen Femoraliskatheter Vorbereitend wurde ein Propylene-Katheter (0,28 ID/0.61 OD, Portex, GB) präpariert. Um

den Innendurchmesser des Katheters weiter zu verkleinern und somit das Einführen des Katheters zu erleichtern wurde dieser durch vorsichtiges Erhitzen und folgendem Längszug weiter verschmälert. Nach Erreichen einer entsprechenden Narkosetiefe (Fehlen von Schmerzreflexen bei Druck auf digitalen Nagelfalz) wurde zunächst am außenrotierten Bein die Haut an der Oberschenkelinnenseite mit einem ca. 0,5 cm langen Hautschnitt durchtrennt. Anschließend wurde die Arteria femoralis freipräpariert und vorsichtig von der begleitenden Vene und dem begleitenden Nerv getrennt (vgl. Abbildung 2.18). Daraufhin wurde die Arterie mittels Prolene-Fäden (7/0, Ethicon, USA) im distalen Segment ligiert und im proximalen Segment ein lockerer Knoten vorgelegt. Unter leichten Zug an der distalen Ligatur wurde eine Blutleere des Gefäßes erzeugt und dieses mit Hilfe einer 26G 1/2"-Kanülenspitze (0,45 mm × 13 mm) (Microlance 3, Becton Dickinson, Heidelberg) inzidiert. Nach der Gefäßinzision wurde der Katheter in die Arterie eingeführt und mit weiteren Prolene-Fäden an der Arterie und an der Haut fixiert. Die korrekte Lage des Katheters wurde durch Aspiration des arteriellen Blutes überprüft. Die isolierten Thrombozyten (siehe Abschnitt 2.7.3) wurden mittels Tyrodes-Puffer $pH = 7,4$ auf eine Zellkonzentration von $150 \times 10^3/\mu l$ eingestellt und jedem Versuchstier vor Denudation $250 \mu l$ über den Katheter appliziert. Es wurden jeweils Spender- und Empfängertiere vom gleichen Genotyp verwendet (d.h. $SphK1/2^{wt/wt} \rightarrow SphK1/2^{wt/wt}$, $SphK1^{-/-} \rightarrow SphK1^{-/-}$, $SphK2^{-/-} \rightarrow SphK2^{-/-}$).

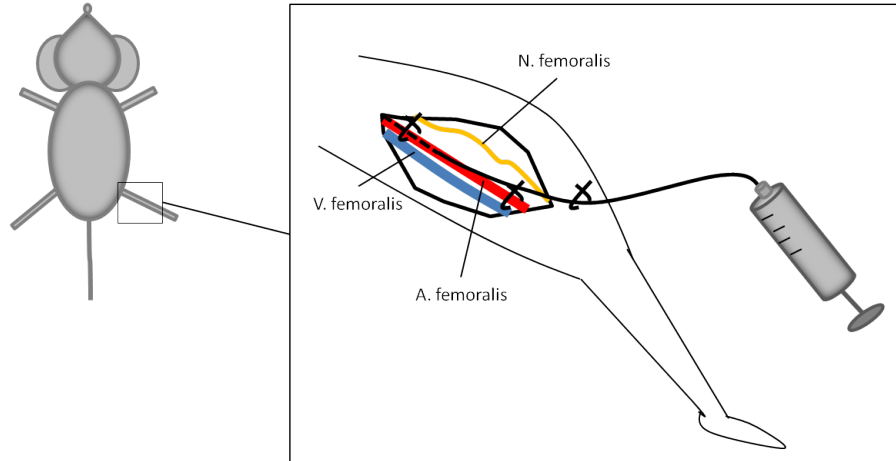


Abbildung 2.18 – Lage des Femoraliskatheters zur Applikation fluoreszenzmarkierter Thrombozyten

Denudation der Arteria Carotis Communis Sinistra Die Induktion der arteriellen Thrombose erfolgte durch Endothelzelldenudation unter Modifikation des von Lindner

et al. beschriebenen Drahtmodells (Lindner et al., 1993). In Abbildung 2.19 ist die nachfolgend geschilderte Operationstechnik schematisch dargestellt. Zuerst erfolgte ein medianer Hautschnitt vom Kinnwinkel (Ramus mandibularis) bis zum Sternum und die beidseitige Vorverlagerung der Speicheldrüsen (Glandulae mandibularis) nach kranial. Zur beidseitigen Darstellung der Carotiden wurde unter Verwendung zweier Pinzetten (Nr. 07.61.06, Fa. Medicon, Tuttlingen) seitlich der Trachea stumpf in die Tiefe der medialen Halsregion präpariert. Dabei wurde besonders auf den parallel zu der Arterie verlaufenden Nervus Vagus geachtet, der äußerst behutsam aus der Gefäß-Nervenscheide gelöst wurde. Die mobilisierte Arteria Carotis Communis wurde daraufhin mittels eines unter gelegten flexiblen Plastikplättchens an der Oberfläche gehalten. Sie war dadurch für die weitere Operation und die darauffolgenden intravitalmikroskopischen Aufnahmen besser zugänglich. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass das exponierte Gewebe durch regelmäßige Befeuchtung mit 0,9%iger Kochsalzlösung nicht austrocknen konnte. Die folgende Induktion der arteriellen Thrombose wurde ausschließlich an der linken Arteria Carotis Communis durchgeführt. Die rechte diente dabei als Negativkontrolle. Um den kaudalen Teil der Arteria Carotis Communis und dem kranialen Teil der Arteria Carotis Externa wurden je ein Fadenzügel (Prolene Polypropylen, 6-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) gelegt und diese mittels Moskitoklemmen (Nr. 15.40.12, Fa. Medicon, Tuttlingen) unter Spannung gehalten. Dadurch konnte für die spätere Denudation eine temporäre Blutleere erzeugt werden. Es folgte die Ligatur (Prolene Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) der Arteria Carotis Interna an ihrem kranialen Ende. Bifurkationsnah wurde ein weiterer Knoten (Prolene Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) locker vorgelegt. Unter Spannung der Fadenzügel wurde die Arteria Carotis Interna zwischen der Ligatur und dem vorgelegten Knoten inzidiert. Ein Angioplastiedraht (Floppy II Guide Wire 0,014 (0,36mm), Guidant Corporation, Diegem, Belgien) wurde über die Inzision in das Lumen der Arteria Carotis Communis vorgeführt (ca. 1cm) und daraufhin zweimal vor- und zurück bewegt. Hierbei wurde besonders auf einen standardisierten Bewegungsablauf geachtet um in allen Versuchsgruppen reproduzierbare Verletzungen zu induzieren. Nach Entfernung des Drahtes wurde die Arteria Carotis Interna mittels des vorgelegten Knotens bifurkationsnah ligiert und unter Lockerung der Fadenzügel die Perfusion wieder hergestellt. Es folgte die intravitalmikroskopische Dokumentation der arteriellen Thrombose.

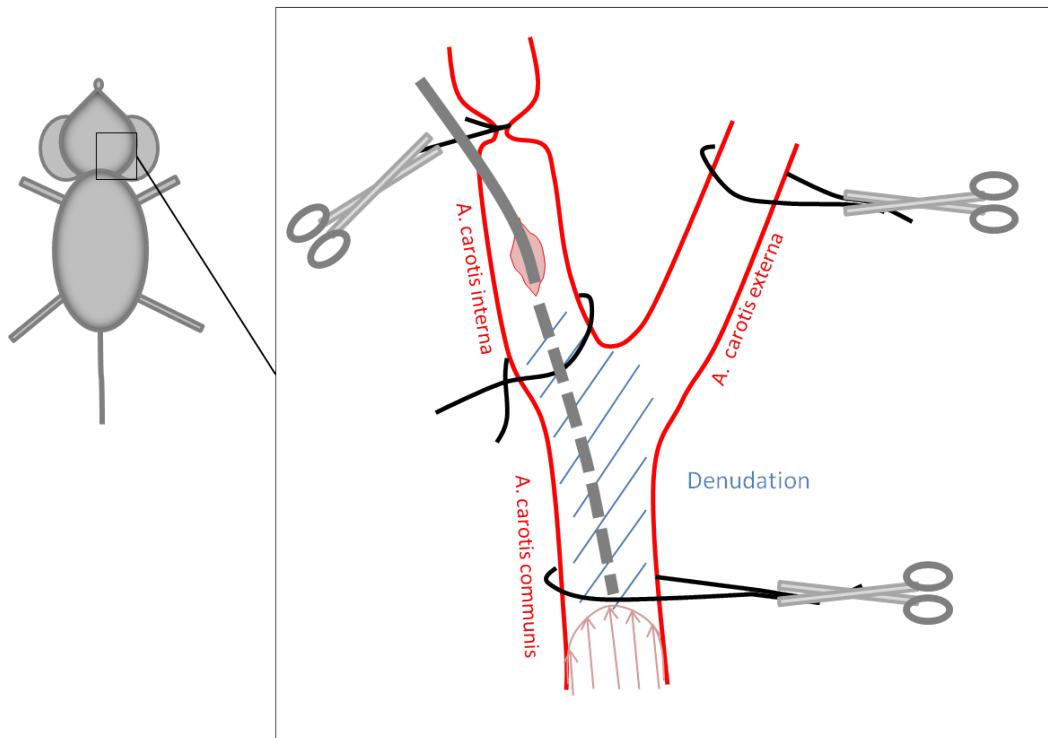


Abbildung 2.19 – Schematische Darstellung der Endotheldenudation im Drahtmodell der Maus

2.9.3 Intravitalmikroskopische Darstellung des Denudationsschadens

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51WI unter Verwendung des Wasserimmersionsobjektivs, XLUMPlanFI 20x/0,95W, Fa. Olympus, Hamburg erstellt. Der detaillierte Strahlengang und die verwendete Kamera und Filtersets werden in Abschnitt 2.6 genauer beschrieben. Es ist besonders darauf zu achten, dass sich zwischen Gewebe und Objektiv stets ausreichend 0,9%ige Kochsalzlösung befindet, da dies Voraussetzung für die adäquate Funktion des Objektivs ist. Thrombozytenadhäsion und -aggregation wurden sowohl vor, als auch nach Denudation der Arteria carotis communis an definierten Lokalisationen mittels intravitaler Videofluoreszenzmikroskopie dargestellt (Massberg et al., 2003, 2004, 2005). Es wurde jeweils eine Aufnahme im Bereich der Carotisbifurkation (Aufzweigung der Arteria carotis interna und externa) und zwei weiteren Aufnahmen im Bereich der Arteria carotis communis gemacht (siehe Abbildung 2.20). Die Aufnahmen erfolgten nach dem in Abbildung 2.21 dargestellten Zeitschema.

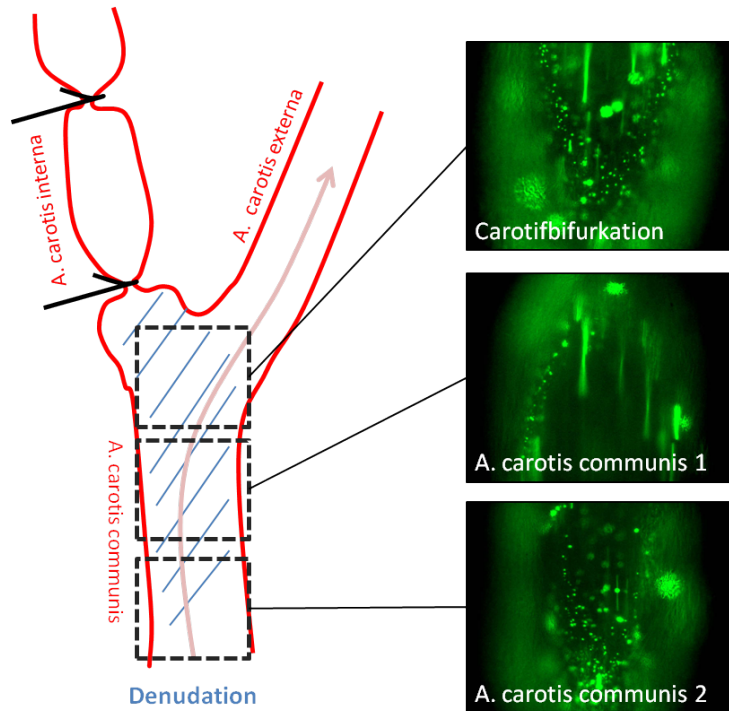


Abbildung 2.20 – Aufnahmelokalisationen zur Darstellung der Denudation

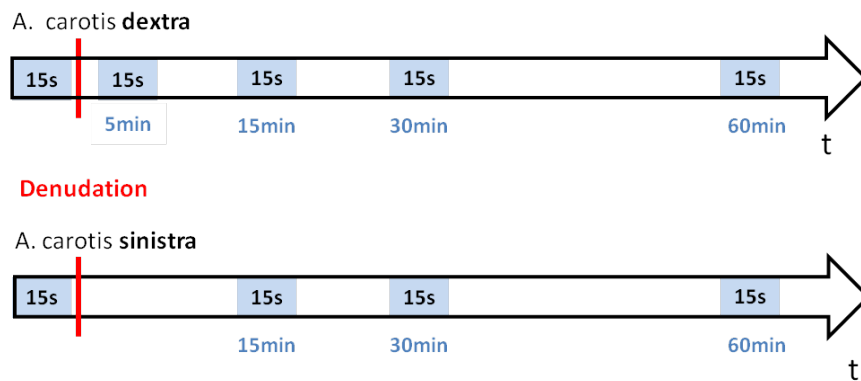


Abbildung 2.21 – Zeitschema der Videodokumentation nach Denudation

2.9.4 Quantifizierung der Daten

Zur Quantifizierung der Daten wurde zuerst mit Hilfe der CellR Software (Fa. Olympus, Hamburg), immer an identischer Stelle für alle drei Gefäßlokalisationen ein Auswertungsfenster der Größe $100\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$ definiert. Um die Anzahl der adhärenen Thrombozyten zu messen wurden aus jeder Filmsequenz sechs repräsentative Standbilder gewählt

und manuell ausgezählt. Es wurde der Mittelwert aus diesen sechs Einzelwerten gebildet und dieser zwischen den Gruppen verglichen. Im Rahmen der Auswertung wurde einerseits die Anzahl adhärenter Thrombozyten ermittelt, andererseits wurde zusätzlich die Adhäsionsfläche der Thrombozyten gemessen. Um die Adhäsionsfläche zu bestimmen wurde die in Abschnitt 2.7.5 beschriebene Software CapImage (Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) verwendet. Hierfür wurden aus jeder Filmsequenz drei repräsentative Standbilder gewählt und anhand des Fluoreszenzsignals die Adhäsionsfläche gemessen. Für jede Lokalisation wurde ein Mittelwert gebildet und dieser zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen.

2.10 In vivo-Analyse der Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach Gefäßwandschädigung mittels Eisen(III)-chlorid

Um die Beteiligung der Sphingosinkinasen auf die Plättchenaggregation und Thrombusformation im lebenden Organismus zu untersuchen wurde die von Farrehi et al. und Fay et al. publizierte Methode der FeCl_3 -Verletzung verwendet (Farrehi et al., 1998; Fay et al., 1999). Diese daraufhin folgende Thrombusformation wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie intravitalmikroskopisch beobachtet. Im folgenden wird der Versuchsaufbau detailliert beschrieben.

2.10.1 Operationstechnik

Nach Kontrolle der suffizienten Narkosetiefe (siehe 2.9.1) wurde ein Femoraliskatheter zur späteren Applikation fluoreszenzmarkierter Thrombozyten gelegt (siehe Abschnitt 2.18). Dem Protokoll der Denudationsversuche entsprechend, wurden die isolierten Thrombozyten (siehe Abschnitt 2.7.3) mittels Tyrodes-Puffer $pH = 7,4$ auf eine Zellkonzentration von $150 \times 10^3/\mu\text{l}$ eingestellt und jedem Versuchstier vor setzen der Läsion $250\mu\text{l}$ über den Katheter appliziert. Es wurden jeweils Spender- und Empfängertiere vom gleichen Genotyp verwendet (d.h. $Sphk1/2^{+/+} \rightarrow Sphk1/2^{+/+}$, $Sphk1^{-/-} \rightarrow Sphk1^{-/-}$, $Sphk2^{-/-} \rightarrow Sphk2^{-/-}$). Die operative Freilegung der Carotiden erfolgte daraufhin wie

in Abschnitt 2.9.2 beschrieben. Auch hierbei wurden die Carotiden mittels unter gelegten Plastikplättchen an der Oberfläche gehalten und auf die stetige Benetzung mit Kochsalzlösung geachtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Es folgte daraufhin die Induktion des FeCl_3 -Schadens mittels eines in 10%iger FeCl_3 -Lösung getränkten Filterpapiers (15 μl auf 0,5x1cm) (siehe Abbildung 2.22). Nach Entfernen der Kochsalzlösung und Abtupfen des Gefäßes wurde der Rand des Filterpapiers für 3min an die laterale Adventitia der linken Arteria Carotis Communis angelegt. Der Kontakt mit der apikalen Carotiswand ist zu vermeiden, da hierdurch die spätere intravitalmikroskopische Aufnahme der Läsion erschwert wird. Nach 3min wurde das Filterpapier entfernt und das Gefäß mit Kochsalzlösung gewaschen. Daraufhin wurde die Thrombusbildung mittels Intravitalmikroskopie dokumentiert (2.23).

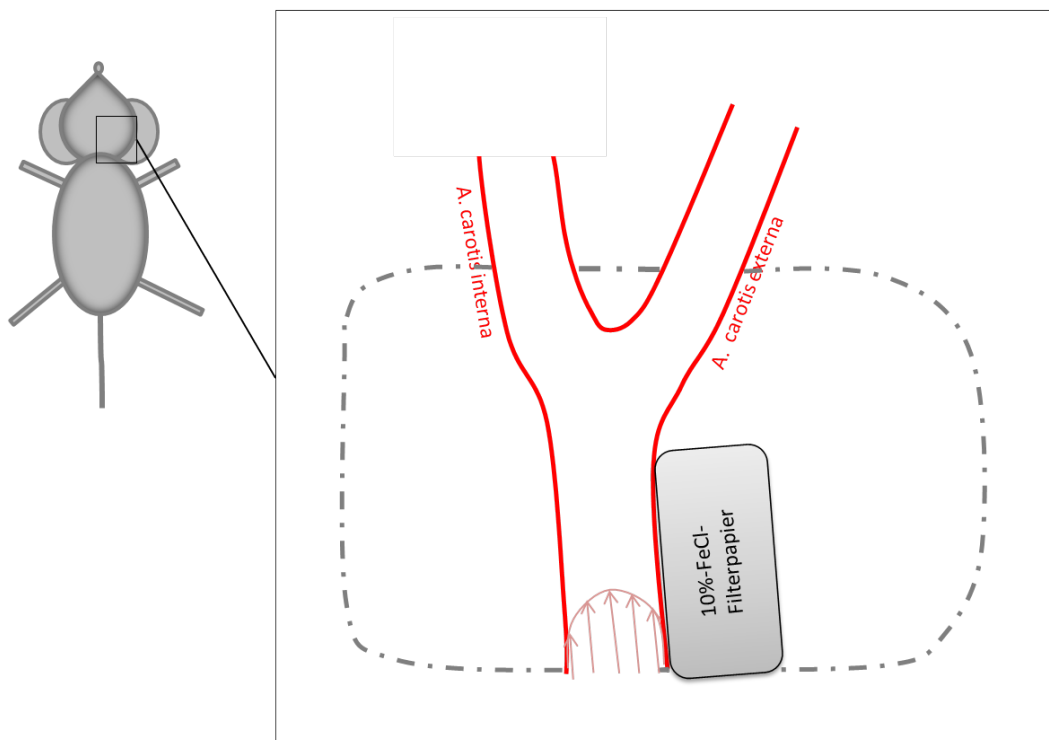


Abbildung 2.22 – Schematische Darstellung der intravitalen FeCl_3 -Verletzung der Arteria Carotis Communis

2.10.2 Intravitalmikroskopische Darstellung der Thrombusformation nach Gefäßwandschädigung mittels Eisen(III)-chlorid

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axio-
tech unter Verwendung des Wasserimmersionsobjektivs, Achroplan 20x/0.5 W (Fa. Zeiss,
Jena) erstellt. Der detaillierte Strahlengang und die verwendeten Filtersets werden in
Abschnitt 2.6 genauer beschrieben. Die Thrombusformation wurde mit einer CCD Ka-
mera (BC-71, Fa. Horn Imaging, Aalen) (siehe 2.6.2) und einem Videorecorder (AG7355,
Fa. Panasonic, Hamburg) auf Videokassette (Super VHS Pro, Fa. Fujifilm, Duesseldorf)
aufgezeichnet. Es wurde jeweils ein Zeitfenster von 60min aufgenommen.

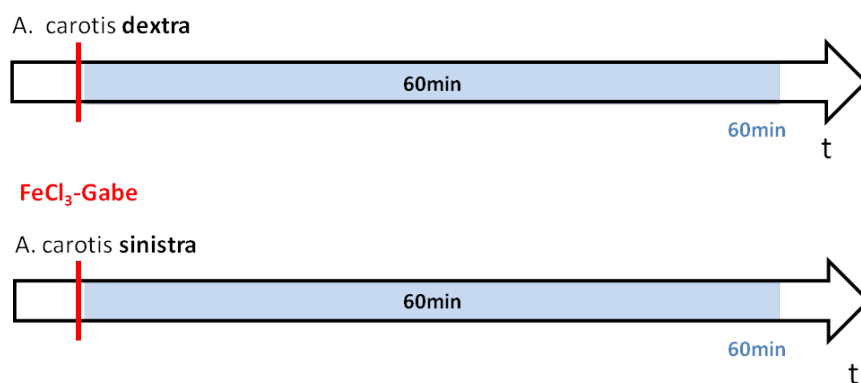


Abbildung 2.23 – Zeitschema der Videodokumentation nach FeCl_3 -Gabe

2.10.3 Quantifizierung der Daten

Folgende Parameter wurden den Videoaufzeichnungen entnommen und statistisch aus-
gewertet (siehe 2.11): (1) der prozentuale Anteil der okkludierten Gefäße, (2) die Offen-
wahrscheinlichkeit, der Gefäße im Zeitverlauf nach FeCl_3 -Applikation, (3) der Zeitpunkt
der Okklusion und (4) die Okklusionsdauer. Ein Gefäß wird als verschlossen bezeichnet,
wenn es proximal der Läsion zu Pendelbewegungen des Blutfusses kommt und distal
der Läsion kein Fluss mehr zu erkennen ist, also keine fluoreszenzmarkierten Zellen den
Thrombus passieren können. Als reperfundiert werden Gefäße bezeichnet, bei denen
es im Bereich des Thrombus zur Kanalbildung kommt und dadurch erneuter Blutfluss
sichtbar wird.

2.11 Versuchstierzahlen und Statistik

Die Versuchstierzahl, die Geschlechterverteilung und das Alter der verwendeten Tiere in den einzelnen Versuchen werden tabellarisch im Anhang dargestellt (Tabelle 5.1 - Tabelle 5.14).

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware „R“ (<http://www.r-project.org/>). Für die explorative Analyse der S1P-Plasmaspiegel, des thrombozytären/erythrozytären S1P-Gehalts und der erythrozytären SphK-Aktivität wurde unter Annahme der Normalverteilung der Daten global mittels „Analysis of Variance“ (ANOVA) getestet und als „Post-Hoc-Test“ der paarweise t-Test verwendet (Venkataraman et al., 2008; Zemmann et al., 2006; Bland and Altman, 2009). Dieser Test ermöglicht den Vergleich der einzelnen Gruppen, wenn mittels ANOVA signifikante Unterschiede ermittelt wurden. In der statistischen Auswertung der ATP/Arachidonsäure/TXB2/PGE2-Freisetzung, sowie der Flusskammer-, Vollblutaggregations- und Denudationsversuche wurden die Gruppen global mittels Kruskal-Wallis-Test verglichen. Hierbei handelt es sich um einen parameterfreien Test, der im Rahmen einer Varianzanalyse testet, ob unabhängige Gruppen in Bezug auf eine ordinalskalierte Variable aus einer gemeinsamen Population entstammen. Als „Post-Hoc-Test“, wurde der Holm-korrigierte Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dieser Test ermöglicht den Vergleich der einzelnen Gruppen, wenn mittels Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede ermittelt wurden. Als signifikant wurde ein Unterschied zwischen zwei Gruppen jeweils gewertet, wenn der entsprechende statistische Test einen p-Wert $< 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit) lieferte. D.h. wenn die Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen den getesteten Gruppen existiert mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 0,95$ abgelehnt werden konnte. Für die Analyse der Daten der FeCl₃-Läsion wurde zum Vergleich der Okklusionswahrscheinlichkeiten zwischen den unterschiedlichen Gruppen der exakte Fischer-Test verwendet. Dieser Test prüft, ähnlich dem Chi-Quadrat-Test die Unabhängigkeit innerhalb von Häufigkeitstabellen (Kontingenztabellen) und wird auch als exakter Chi-Quadrat-Test bezeichnet. Er liefert im Gegensatz zum Chi-Quadrat-Test aber auch bei geringer Anzahl von Beobachtungen genaue Werte. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde ein Unterschied zwischen den Gruppen als signifikant erachtet. Zur Analyse der Offenwahrscheinlichkeit eines Gefäßes im zeitlichen Verlauf nach Induktion des Schadens wurde der Log-Rank-Test durchgeführt. Der Log-Rank-Test ist das Standardverfahren in der Überlebensanalyse für Gruppenvergleiche, wie z.B. der Vergleich unterschiedlicher The-

rapien in klinischen Studien (Ziegler et al., 2007). Seine Anwendung lässt sich aber, wie in unserem Falle auch auf andere Fragestellungen übertragen. Auch hier wurde mit einem Signifikanzniveau von 5% getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Sphingosinkinase 2 ist die dominante Isoform in Thrombozyten und für die S1P-Bildung und -Freisetzung verantwortlich

Aus einigen vorausgehenden Arbeiten ist bereits bekannt, dass Thrombozyten S1P speichern und dieses auch in das Blutplasma sekretieren können (Yatomi et al., 1995, 2000). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Sphingosinkinaseisoformen, die für die Bildung und Freisetzung des thrombozytären S1Ps verantwortlich sind. Es wurden hierzu Thrombozyten von Wildtyp-, SphK1^{-/-}- und SphK2^{-/-}- Mäusen isoliert und die Thrombozytenlysate massenspektrometrisch auf S1P (LC-MS/MS) untersucht. Während die SphK1-defizienten Thrombozyten einen leichten Anstieg der intrazellulären S1P Konzentration gegenüber der Wildtypkontrolle aufweisen, ist in den SphK2-defizienten Thrombozyten kaum S1P nachweisbar (Abbildung 3.1 A). Aus diesem Ergebnis lässt sich einerseits schlussfolgern, dass SphK2 für die S1P Bildung verantwortlich ist, andererseits wird auch deutlich, dass SphK1 nicht den Funktionsverlust der SphK2 in Thrombozyten kompensieren kann. Um die Rolle der Sphingosinkinaseisoformen für die Freisetzung von S1P aus Thrombozyten genauer zu charakterisieren wurden daraufhin Überstände ruhender und mit Thrombin aktivierter Wildtyp-, SphK1^{-/-}- und SphK2^{-/-}- Thrombozyten mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Ruhende Wildtyp- und SphK1^{-/-}- Thrombozyten sekretieren S1P in den Überstand. Diese S1P-Freisetzung kann durch Aktivierung mit Thrombin gesteigert werden (Abbildung 3.1 B). Hingegen sekretieren SphK2^{-/-}-Thrombozyten weder in Ruhe, noch nach Aktivierung S1P in den Überstand. Diese Ergebnisse zeigen, dass SphK2 sowohl für die intrazelluläre S1P-Bildung in Thrombozyten, als auch für die extrazelluläre Freisetzung von S1P aus Thrombozyten unerlässlich ist. Im Weiteren wurde auch die Rolle der

verschiedenen Sphingosinkinasen in der S1P-Bildung in Erythrozyten getestet, die als Hauptquelle des plasmatischen S1Ps gelten (Allende et al., 2004). Hierzu wurden Erythrozyten aus Wildtyp-, SphK1^{-/-}- und SphK2^{-/-}- Mäusen isoliert und die Erythrozytenlysate mittels LC-MS/MS untersucht. Interessanter Weise zeigen SphK2-defiziente Erythrozyten keinen Unterschied der intrazellulären S1P-Spiegel im Vergleich zur Wildtypkontrolle, während in SphK1-defizienten Erythrozyten annähernd kein S1P nachweisbar ist (Abbildung 3.2 A). Im Folgenden wurden Sphingosinkinaseassays mit isolierten Erythrozyten der verschiedenen Gruppen durchgeführt. Auch hier zeigt sich, vergleichbar zu den erythrozytären S1P Spiegeln, kein Unterschied der Sphingosinkinaseaktivität zwischen Wildtyp- und SphK2-defizienten Tieren, während in SphK1-defizienten Tieren keine Sphingosinkinaseaktivität nachweisbar ist (Abbildung 3.2 B). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass SphK2 die Hauptisoform der Sphingosinkinasen in Thrombozyten darstellt und für die Bildung und Freisetzung von thrombozytären S1P verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu ist in Erythrozyten vorrangig die SphK1-Isoform aktiv und für die Bildung des erythrozytären S1Ps verantwortlich.

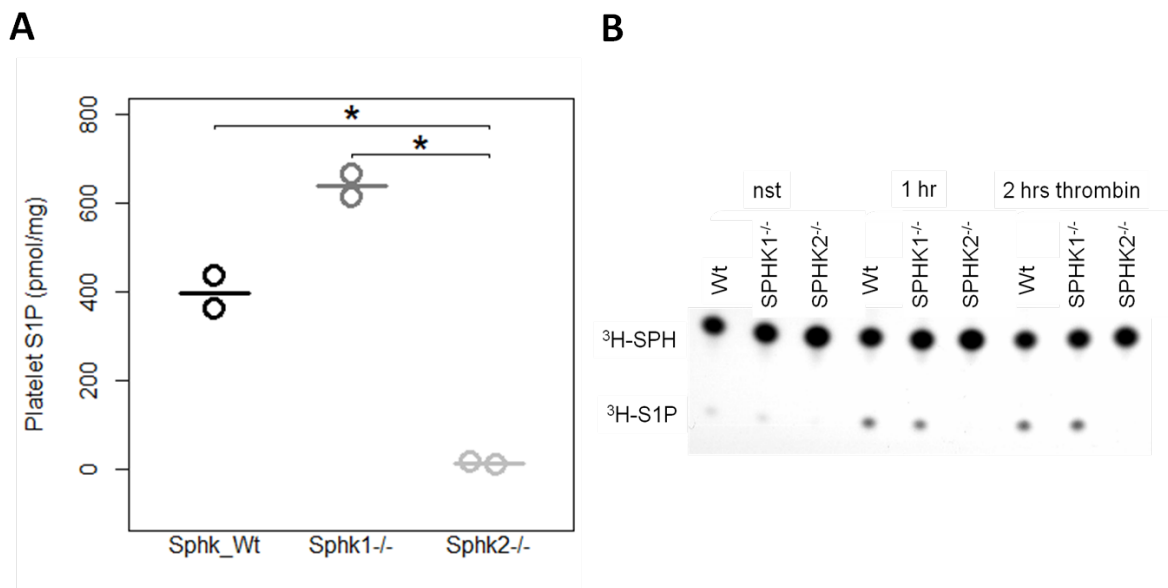


Abbildung 3.1 – S1P-Konzentration und SphK-Aktivität in Thrombozyten. **(A)** Die massenspektrometrische Analyse der Zellysate zeigt eine deutliche Reduktion des intrazellulären S1Ps (pg/ml) in SphK2^{-/-}- Thrombozyten. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte unabhängiger Experimente und ihre jeweiligen Mittelwerte. n=2; * = $p < 0.05$. **(B)** zeigt das [³H]-S1P- Autoradiogramm der Thrombozytenüberstände nach Dünnschichtchromatographie ohne/mit vorheriger Thrombinaktivierung. SphK2^{-/-}- Thrombozyten zeigen eine deutliche Reduktion der S1P-Freisetzung und dadurch indirekt eine verminderte SphK-Aktivität. nst=ohne Stimulierung.

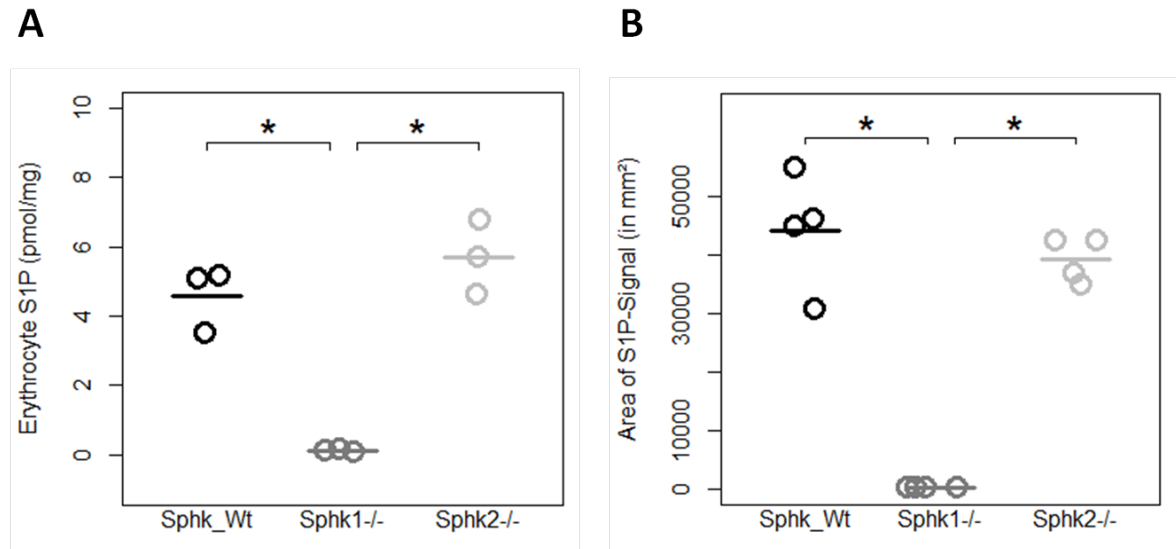


Abbildung 3.2 – S1P-Konzentration und SphK-Aktivität in Erythrozyten. **(A)** Die massenspektrometrische Analyse der Zelllysate zeigt eine deutliche Reduktion des intrazellulären S1Ps (pg/ml) in SphK1^{-/-}-Erythrozyten. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte unabhängiger Experimente und ihre jeweiligen Mittelwerte. n=3; * = $p < 0.05$. **(B)** Im SphK-Assay zeigt die Messung von [³³P]-S1P mittels „Molecular Dynamics Storm Phosphoimager“ eine deutlich verminderte SphK1^{-/-}-Aktivität. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte unabhängiger Experimente und ihre jeweiligen Mittelwerte. n=4; * = $p < 0.05$.

3.2 Thrombozytäres S1P beeinflusst den Plasma-S1P-Spiegel

Basierend auf den Ergebnissen, dass die S1P-Produktion in Thrombozyten und Erythrozyten von verschiedenen Sphingosinekinaseisoformen reguliert wird, stellte sich nun die Frage, ob und wie diese Isoformen den S1P-Plasmaspiegel beeinflussen. Die Messung der S1P-Plasmaspiegel in den verschiedenen Gruppen zeigt, dass SphK1-defiziente Tiere im Vergleich zur Wildtypkontrolle eine ca. 50%ige Reduktion der S1P-Konzentration im Plasma aufzeigen, während SphK2-Defizienz keine signifikante Änderung hervorruft (Abbildung 3.3 A). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten anderer Gruppen (Allende et al., 2004; Zemmann et al., 2006; Ito et al., 2007; Pappu et al., 2007). Diese Daten suggerieren, dass SphK1 einen möglichen thrombozytenassoziierten Plasma-S1P-Verlust in SphK2-defizienten Mäusen ausgleichen kann. Dennoch lässt sich dadurch nicht ausschließen, dass thrombozytäres S1P unter „Steady-State“

Bedingungen an der Aufrechterhaltung des S1P-Plasmaspiegels beteiligt ist. Um dies zu überprüfen, wurden S1P-Plasmaspiegel in NF-E2-defizienten Mäusen gemessen, die keine zirkulierenden Thrombozyten aufweisen. Diese Mäuse zeigen eine 20%ige Reduktion der S1P-Plasmakonzentration, welche durch Transfusion von Wildtypthrombozyten ausgeglichen werden kann (Abbildung 3.3 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass Thrombozyten, wenn gleich sie nicht die Hauptquelle für plasmatishes S1P darstellen, an der Aufrechterhaltung des Plasma-S1P-Spiegels beteiligt sind.

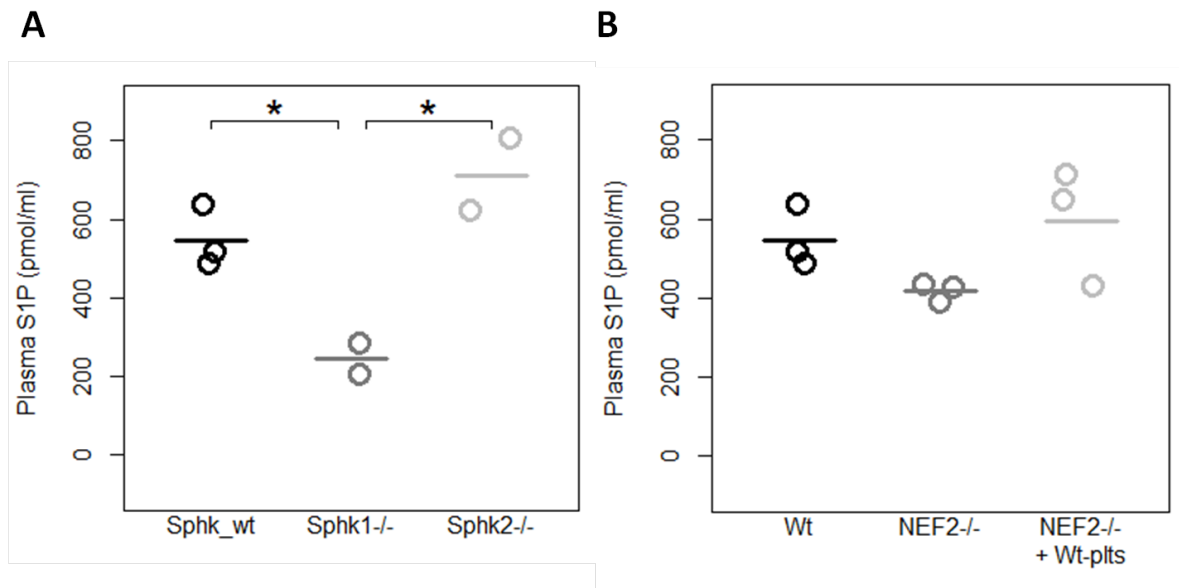


Abbildung 3.3 – S1P-Plasmaspiegel SphK-defizienter Tiere. **(A)** Die massenspektrometrische Messung der Blutplasmen zeigt eine deutliche Reduktion der S1P-Plasma-Spiegel SphK1^{-/-}-Tiere bei leicht erhöhten S1P-Plasma-Spiegeln SphK2^{-/-}-Tiere. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte unabhängiger Experimente und ihre jeweiligen Mittelwerte. n=3/n=2; * = $p < 0.05$. **(B)** Die massenspektrometrische Messung der S1P-Spiegel NF-E2-defizienter Tiere zeigt eine leichte Reduktion, die durch Transfusion von Wildtypthrombozyten kompensiert werden kann. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte unabhängiger Experimente und ihre jeweiligen Mittelwerte. n=3; * = $p < 0.05$.

3.3 SphK1- und SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen eine unauffällige Morphologie

Als nächstes wurde der mögliche Einfluss der thrombozytenspezifischen S1P-Bildung auf die Regulierung der Thrombozytenhomöostase untersucht. Hierzu wurde zuerst die Thrombozytenmorphologie Sphk-defizienter Tiere mit der von Wildtyptieren verglichen. Bei Messung der mittleren Thrombozytenvolumina zeigt sich bei Sphk2-defizienten Mäusen auf BalbC-Hintergrund eine leichte Zunahme des mittleren Volumens ($6,3 \pm 0,47$ fl) gegenüber Sphk1-defizienten- ($5,6 \pm 0,16$ fl) und Wildtyptieren ($5,6 \pm 0,16$ fl) (Abbildung 3.5 B). Da dieser Effekt allerdings auf C57BL/6 Hintergrund nicht beobachtet werden (Abbildung 3.5 A) konnte, handelt es sich wahrscheinlich um ein stammspezifisches Phänomen. Um mögliche morphologische Unterschiede darzustellen wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen ruhender Thrombozyten aus den verschiedenen Gruppen angefertigt. Weder in den Sphk1-, noch in den Sphk2-defizienten Thrombozyten besteht ein morphologischer Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.4). Die Anzahl und Morphologie der Mitochondrien und die Anzahl der spezifischen Granula sind unverändert und geben einen Hinweis darauf, dass die fehlende S1P-Sekretion in Sphk2-defizienten Tieren nicht von einer pathologischen Verteilung intrazellulärer Organellen abhängig ist. Interessanter Weise findet sich sowohl auf C57BL/6- als auch auf BalbC-Hintergrund ein ca. 20-30%ige Minderung der Thrombozytenzahlen im Vollblut (Abbildung 3.6 A und B).

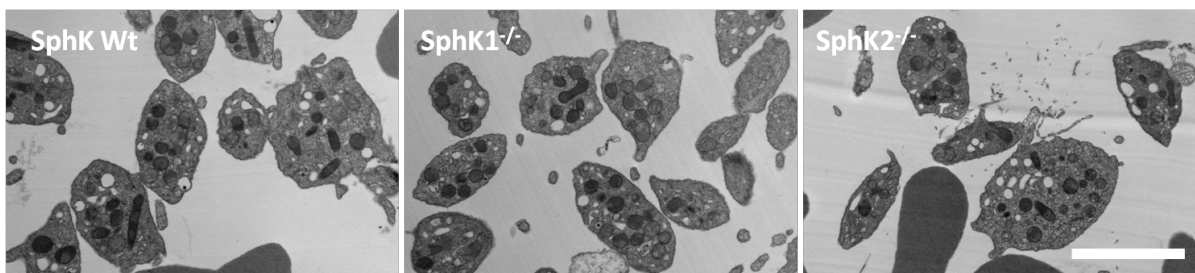


Abbildung 3.4 – Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) SphK-defizienter Thrombozyten. Die TEM zeigt keinen morphologischen Unterschied und keinen Unterschied der intrazellulären Verteilung der Thrombozytenorganellen. Scalebar= $1\mu\text{m}$

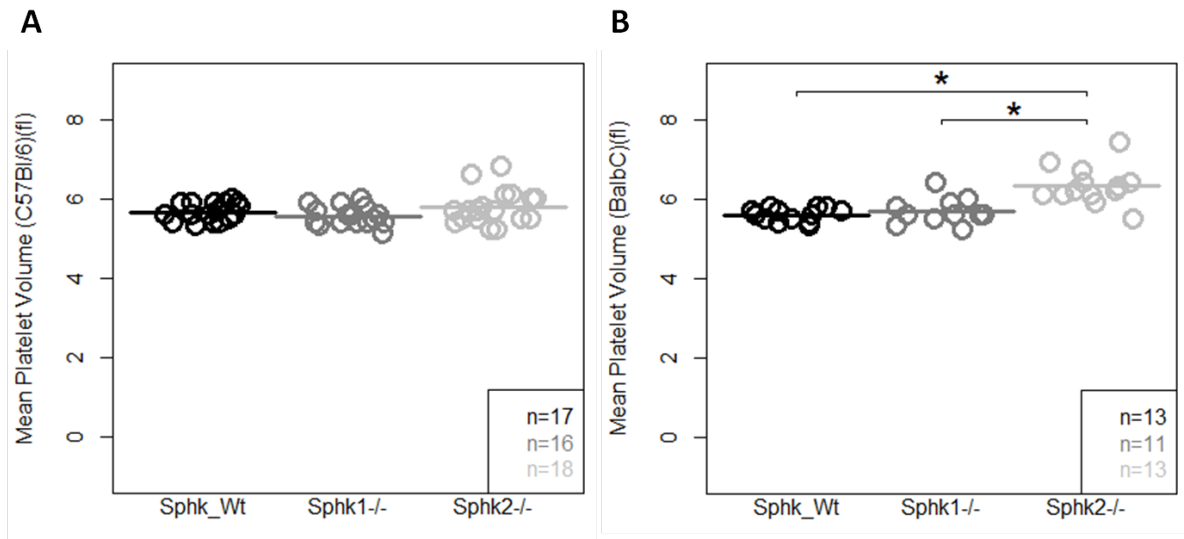


Abbildung 3.5 – Darstellung der Thrombozytenvolumina SphK-defizienter Thrombozyten. **(A)** Die Messung der mittleren Thrombozytenvolumina (fli) SphK1^{-/-}/SphK2^{-/-} ergibt auf C57BL/6-Hintergrund keinen signifikanten Unterschied der Gruppen. **(B)** Auf BalbC-Hintergrund zeigen sich signifikant größere Volumina SphK2^{-/-}-Thrombozyten im Vergleich zur SphK1^{-/-}- und Wildtypkontrolle. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte unabhängiger Experimente und ihre jeweiligen Mittelwerte. * = $p < 0.05$.

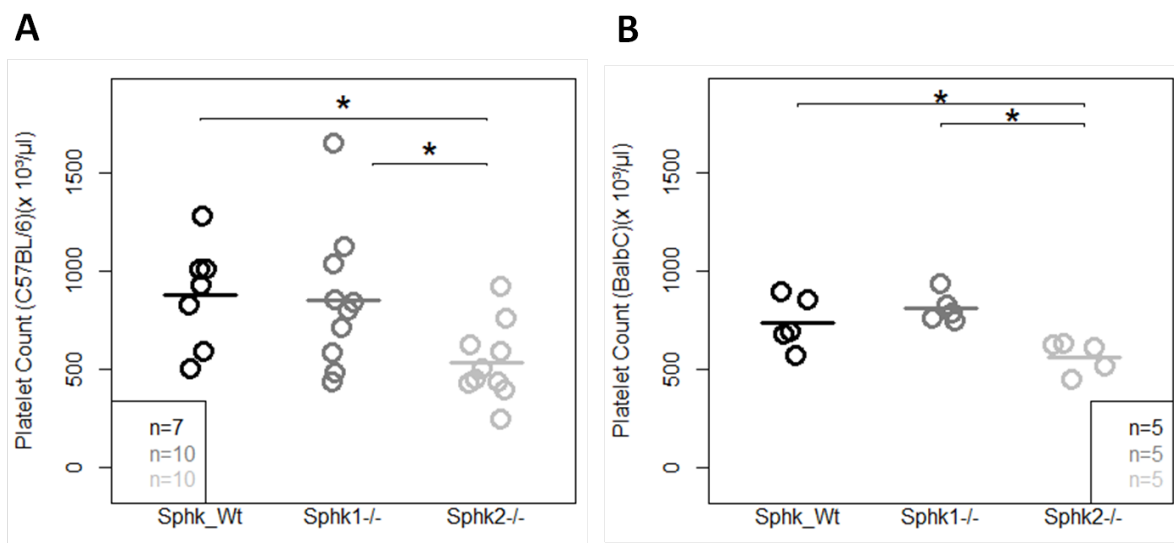


Abbildung 3.6 – SphK2-defiziente-Tiere haben eine verminderte Thrombozytenzahl im Vollblut ((**A**) C57BL/6; (**B**) BalbC). Dargestellt sind die einzelnen Messwerte unabhängiger Experimente und ihre jeweiligen Mittelwerte. * = $p < 0.05$.

3.4 SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen nach Aktivierung eine verminderte Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten

Da aktivierte Thrombozyten eine Vielzahl von Mediatoren freisetzen und dies entscheidend zu ihrer Funktion beiträgt, wurde eine mögliche Beeinträchtigung dieser Eigenschaft in SphK1- und SphK2-defizienten Tieren untersucht. Zuerst wurde die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten untersucht. Nach Aktivierung der isolierten Thrombozyten mit 0,1 U/ml Thrombin wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Freisetzung von Arachidonsäure (siehe Abbildung 3.7 B), PGE₂ (siehe Abbildung 3.7 C) und Thromboxan B₂ (Abbildung 3.7 D) gemessen. Während die Arachidonsäurefreisetzung nur gering erniedrigt ist, zeigt sich in Sphk2-defizienten Thrombozyten, 15-30min nach Thrombinaktivierung eine bis zu 45%ige Reduktion der PGE₂- und eine bis zu 60%ige Reduktion der TXB₂-Freisetzung im Vergleich zur Wildtypkontrolle. SphK1-defiziente Thrombozyten zeigen lediglich eine ca. 25%ige Erniedrigung der PGE₂ Freisetzung 15-30min nach Thrombinaktivierung. Sowohl die Arachidonsäurefreisetzung, als auch die TXB₂-Freisetzung sind im Vergleich zur Wildtypkontrolle nicht vermindert. Eine Vielzahl wichtiger Mediatoren, wie z.B. ADP, ATP und Serotonin wird aus thrombozytären „Dense Granular“ freigesetzt. Es wurde deshalb die ATP Freisetzung, als Indikator der „Dense Granular“-Freisetzung gemessen und zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen. Weder SphK1- noch SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen hierbei einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Wildtypkontrolle (siehe Abbildung 3.7 A).

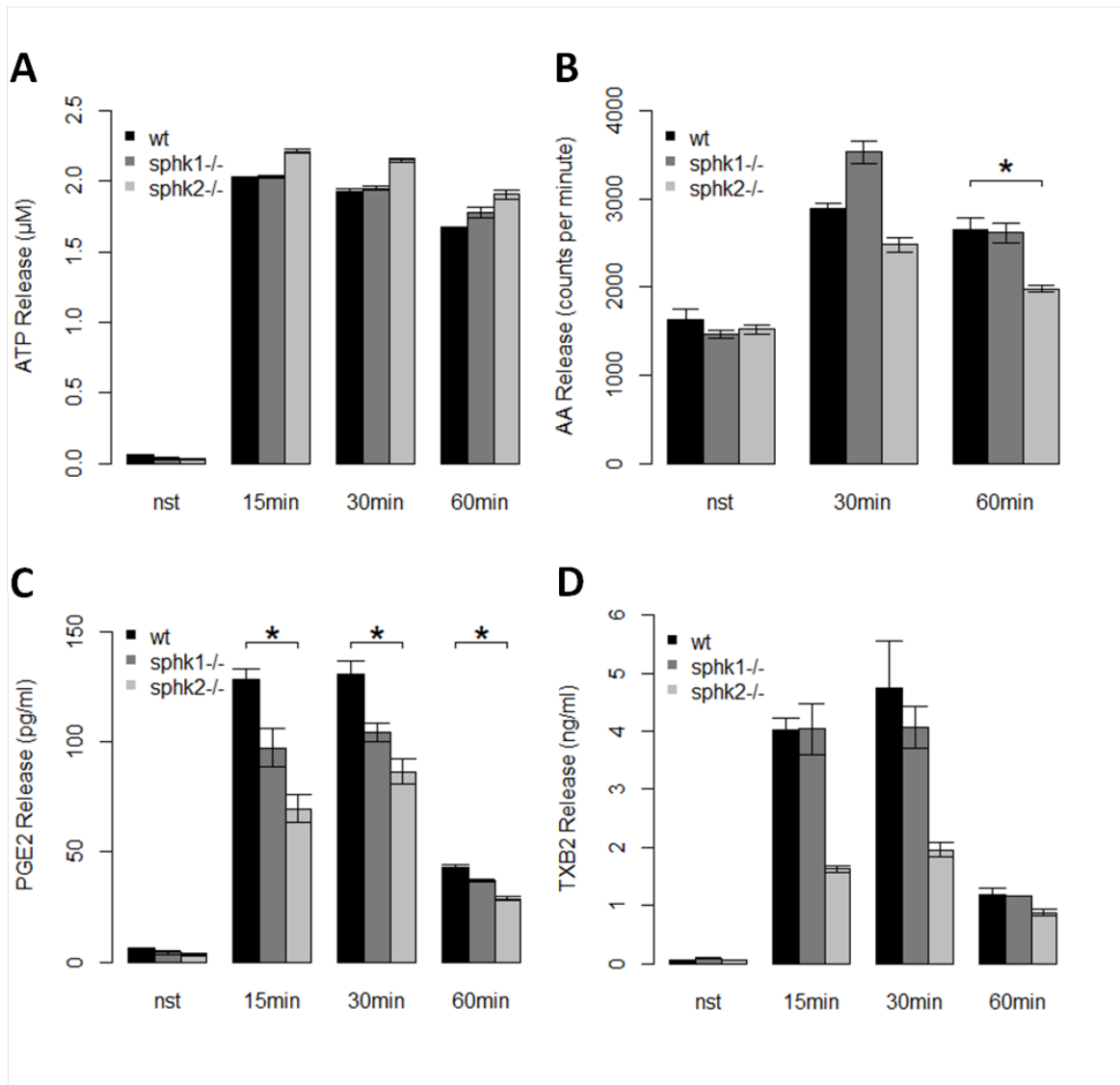


Abbildung 3.7 – Thrombozytensekretion und Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten nach Thrombinaktivierung. **(A)** SphK2^{-/-}-Thrombozyten haben eine unbeeinträchtigte ATP Freisetzung, als Indikator einer normalen „Dense Granular“-Sekretion. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente. $n=3$; $p > 0.05$. **(B)** Die Arachidonsäurefreisetzung in SphK2^{-/-}-Thrombozyten ist nach 60min Thrombinaktivierung leicht vermindert. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente. $n=4$; * = $p < 0.05$. **(C)** Die Prostaglandin E₂-Freisetzung in SphK2^{-/-}-Thrombozyten ist nach Thrombinaktivierung vermindert. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente. $n=3$; * = $p < 0.05$. **(D)** Auch die Thromboxan B₂-Freisetzung zeigt eine Reduktion nach Thrombinaktivierung von SphK2^{-/-}-Thrombozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler unabhängiger Experimente. $n=3$; $p > 0.05$.

3.5 SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen eine normale Adhäsion in vitro und in vivo

Die Fähigkeit auf bestimmten Substraten zu adhären stellt eine grundlegende Voraussetzung für eine adäquate Thrombozytenfunktion dar. Um einen Hinweis auf einen möglichen Adhäsionsdefekt Sphk-defizienter Thrombozyten zu bekommen, wurden deshalb isolierte Thrombozyten bei niedrig arteriellen Scherraten über Matrixproteinbeschichtete Flusskammer slides perfundiert. Nach 5min Perfusion wurde die Fläche der adhärenen Thrombozyten gemessen (siehe Abbildung 3.9). Wie in Abbildung 3.8 dargestellt zeigen weder Sphk1- noch Sphk2-defiziente Thrombozyten einen signifikanten Unterschied in der Adhäsion auf den Substraten Kollagen, Laminin, Fibrinogen und von Willebrandfaktor im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Der rechte Teil der Abbildung 3.8 vergleicht den Einfluss eines Matrixproteins auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten innerhalb einer Gruppe. Man erkennt signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Matrizes, welche durch die unterschiedlich starke Adhäsivität zu erklären sind und eine interne Kontrolle der Beschichtungen darstellen.

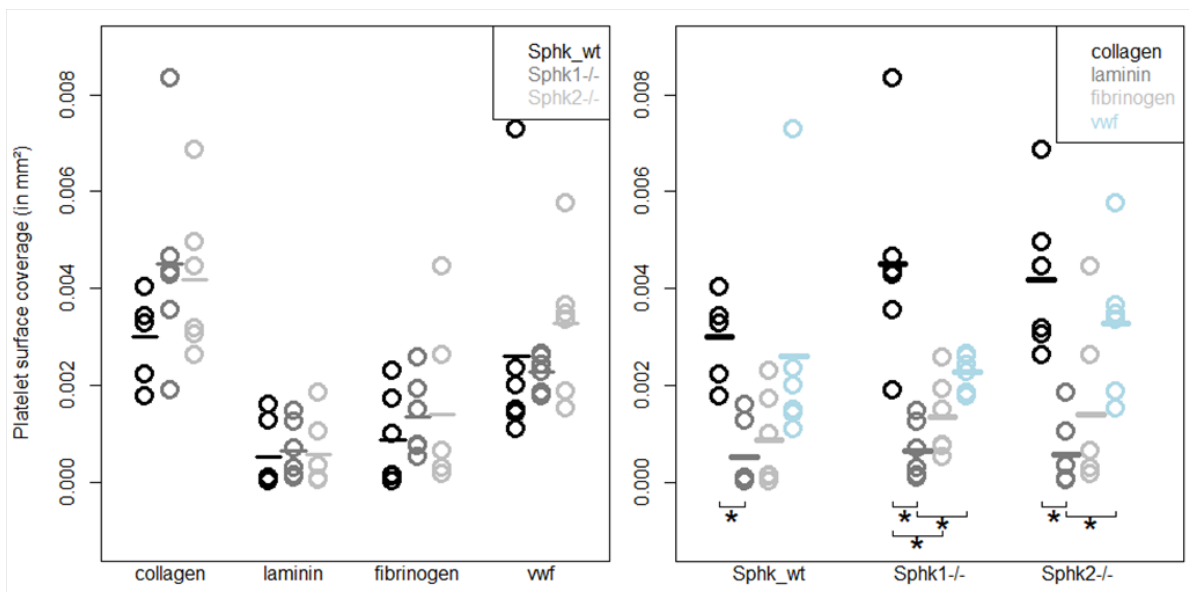


Abbildung 3.8 – Thrombozytenadhäsion im Flusskammermodell. Vergleich der Adhäsion auf verschiedenen Substraten (links) und zwischen $SphK^{wt/wt}$ -, $SphK1^{-/-}$ - und $SphK2^{-/-}$ - Mäusen (rechts). Deutlich sichtbar ist die unterschiedliche Adhäsivität der unterschiedlichen Substrate in allen Gruppen. Im Vergleich der einzelnen Gruppen besteht hingegen kein Unterschied. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment. Der Querbalken gibt den Mittelwert aus allen Experimenten an; $n=6$; $* = p < 0.05$.

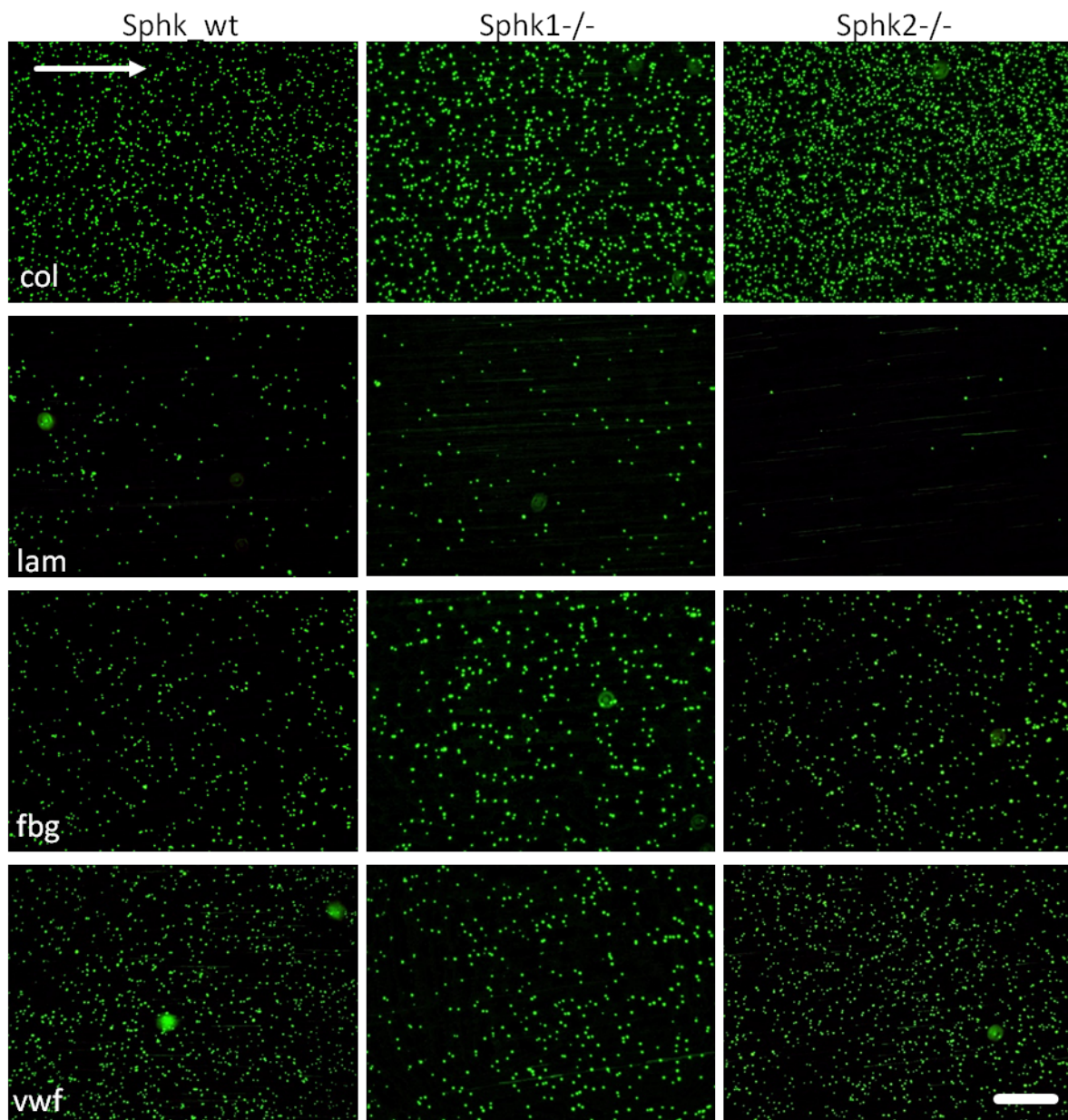


Abbildung 3.9 – Mikrographien der Thrombozytenadhäsion im Flusskammermodell. Es werden spaltenweise $SphK^{(wt/wt)}$ - mit $SphK1^{(-/-)}$ - und $SphK2^{(-/-)}$ - Mäusen, auf verschiedenen Substraten verglichen. Deutlich sichtbar ist die unterschiedliche Adhäsivität der unterschiedlichen Substrate in allen Gruppen. Im Vergleich der einzelnen Gruppen besteht hingegen kein Unterschied. CFDA-SE-markierte Thrombozyten sind in grün dargestellt. col=Collagen; lam=Laminin; fbg=Fibrinogen; vwf=Von-Willebrand-Faktor. Der weiße Pfeil zeigt die Flussrichtung an. Scalebar= $100\mu m$.

Um die Thrombozytenadhäsion unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren wurde ein Mausmodell der Carotidenudation verwendet. Hierzu wurde mit Hilfe eines intraluminale eingeführten Drahtes das Endothel der Arteria Carotis denudiert und die Adhäsion transfundierter, fluoreszenzmarkierter Thrombozyten intravitalmikroskopisch analysiert. Abbildung 3.10 zeigt den Unterschied zwischen intaktem (Sham) und verletztem Endothel. Die Abbildungen 3.12, 3.13 und 3.14 zeigen für jede Gruppe representative Mikrophotografien der denudierten Arteria Carotis an verschiedenen Carotislokalisationen und zu verschiedenen Zeitpunkten. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse (Anzahl der adhärenenten Thrombozyten und Fläche der adhärenenten Thrombozyten pro Dokumentationsfeld) zeigt, wie auch in den Flusskammerversuchen keinen signifikanten Unterschied der Thrombozytenadhäsion SphK1- bzw. SphK2-defizienter Tiere im Vergleich zur Wildtypkontrolle (siehe Abbildung 3.11). Auffällig ist die hohe Streuung der Ergebnisse, die auf die Schwierigkeit der standardisierten Endothelverletzung zurückzuführen ist und in der graphischen Darstellung im Anhang (Abbildung 5.1 - 5.6) noch genauer hervorgehoben wird. Basierend auf diesen Ergebnissen ist nicht auf eine funktionelle Beeinträchtigung SphK-defizienter Thrombozyten hinsichtlich der Adhäsion *in vitro* und *in vivo* zu schließen.

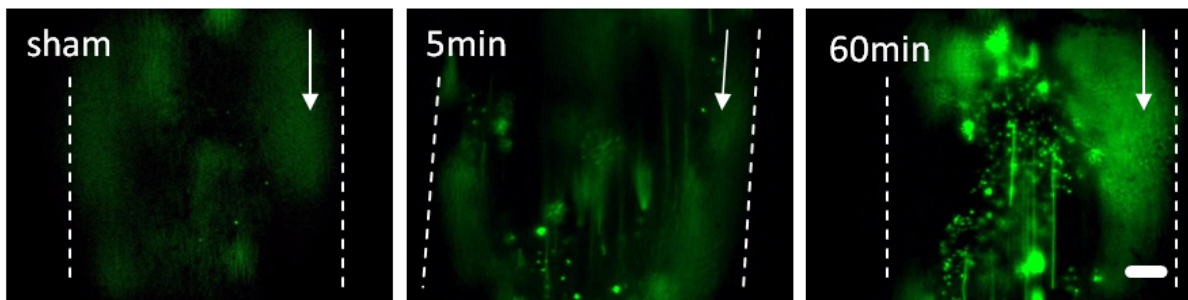


Abbildung 3.10 – Darstellung der Thrombozytenadhäsion nach Denudation der Arteria Carotis Communis. Links: unverletzte Arteria Carotis Communis (Sham); Mitte: Thrombozytenadhärenenz bei 5min nach Denudation; Rechts: Thrombozytenadhärenenz bei 60min nach Denudation. Man sieht eine Zunahme der Thrombozytenadhärenenz im zeitlichen Verlauf. CFDA-SE markierte Thrombozyten sind grün dargestellt. Der weiße Pfeil zeigt die Flussrichtung an. Die gestrichelte, weiße Linie markiert den Rand des Blutgefäßes. Scalebar=50 μ m.

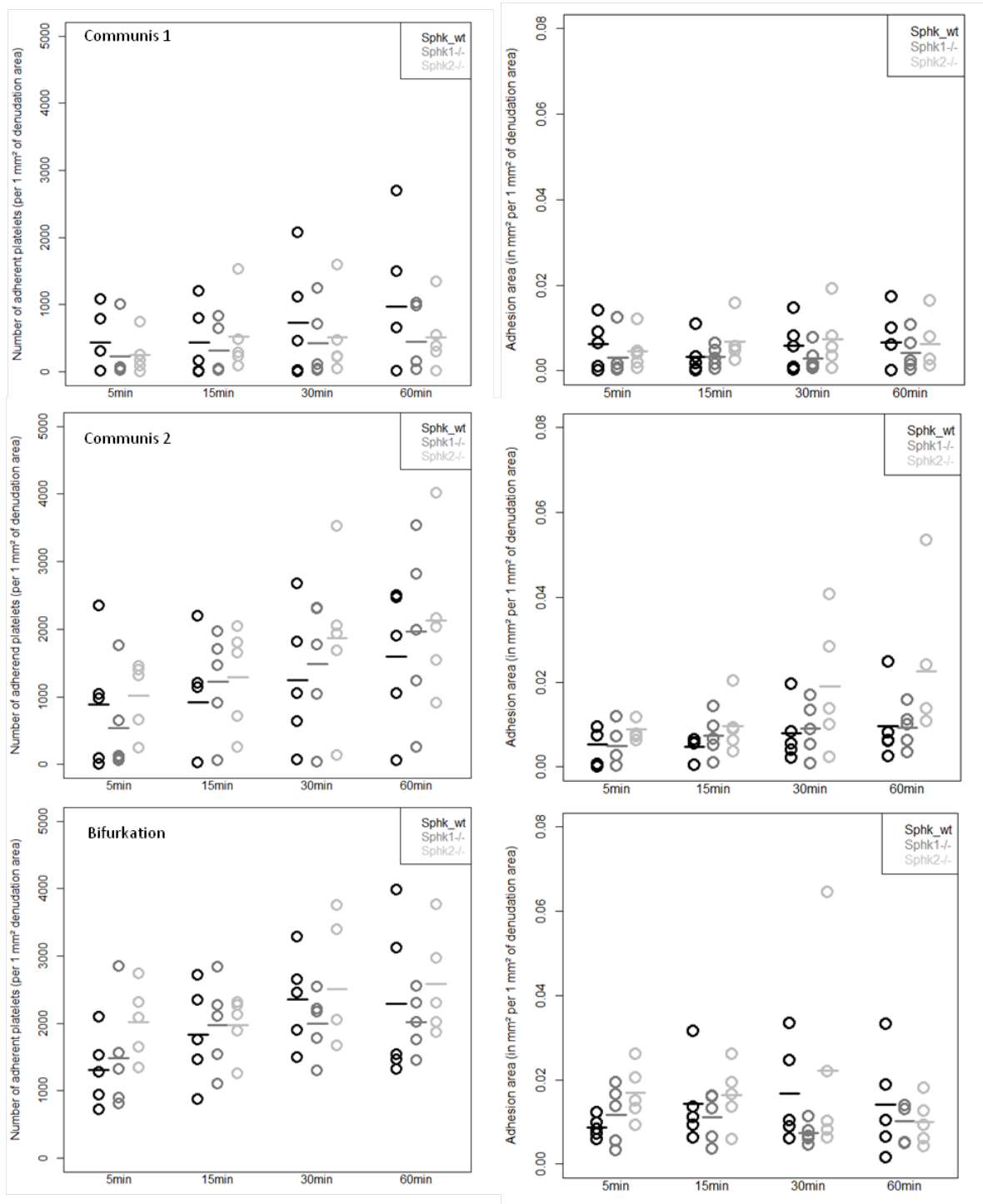


Abbildung 3.11 – Thrombozytenadhäsion nach Denudation der Arteria Carotis Communis in den Bereichen Communis 1, Communis 2 und Bifurcation. Links ist die Anzahl (= Mittelwerte der Thrombozytenzahl pro 1 mm²), rechts die Fläche (= Mittelwerte der Fläche adhärenter Thrombozyten in mm² pro 1 mm²) im Zeitraum von 5-60min dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt und an keiner Lokalisation existiert ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment. Der Querbalken zeigt den Mittelwert aus allen Experimenten an. n=5; $p > 0.05$.

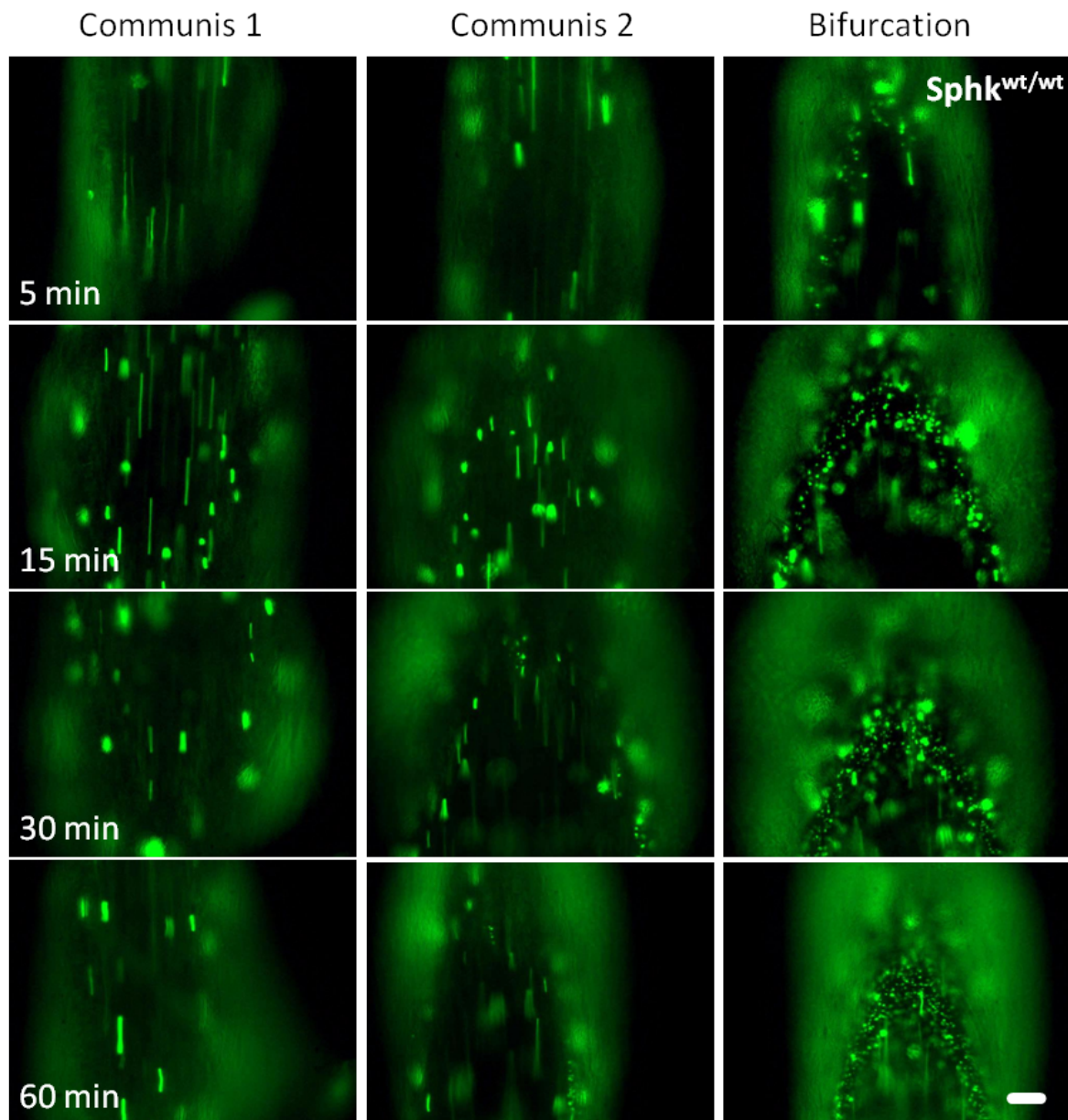


Abbildung 3.12 – Repräsentative Mikrographien nach Denudation der Arteria Carotis Communis einer Wildtyp-Maus nach 5, 15, 30 und 60min. Eine Zunahme der Thrombozytenadhäsion im zeitliche Verlauf ist ersichtlich, während kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen detektiert werden kann. CFDA-SE markierte Thrombozyten sind grün dargestellt. Scalebar= $50\mu m$.

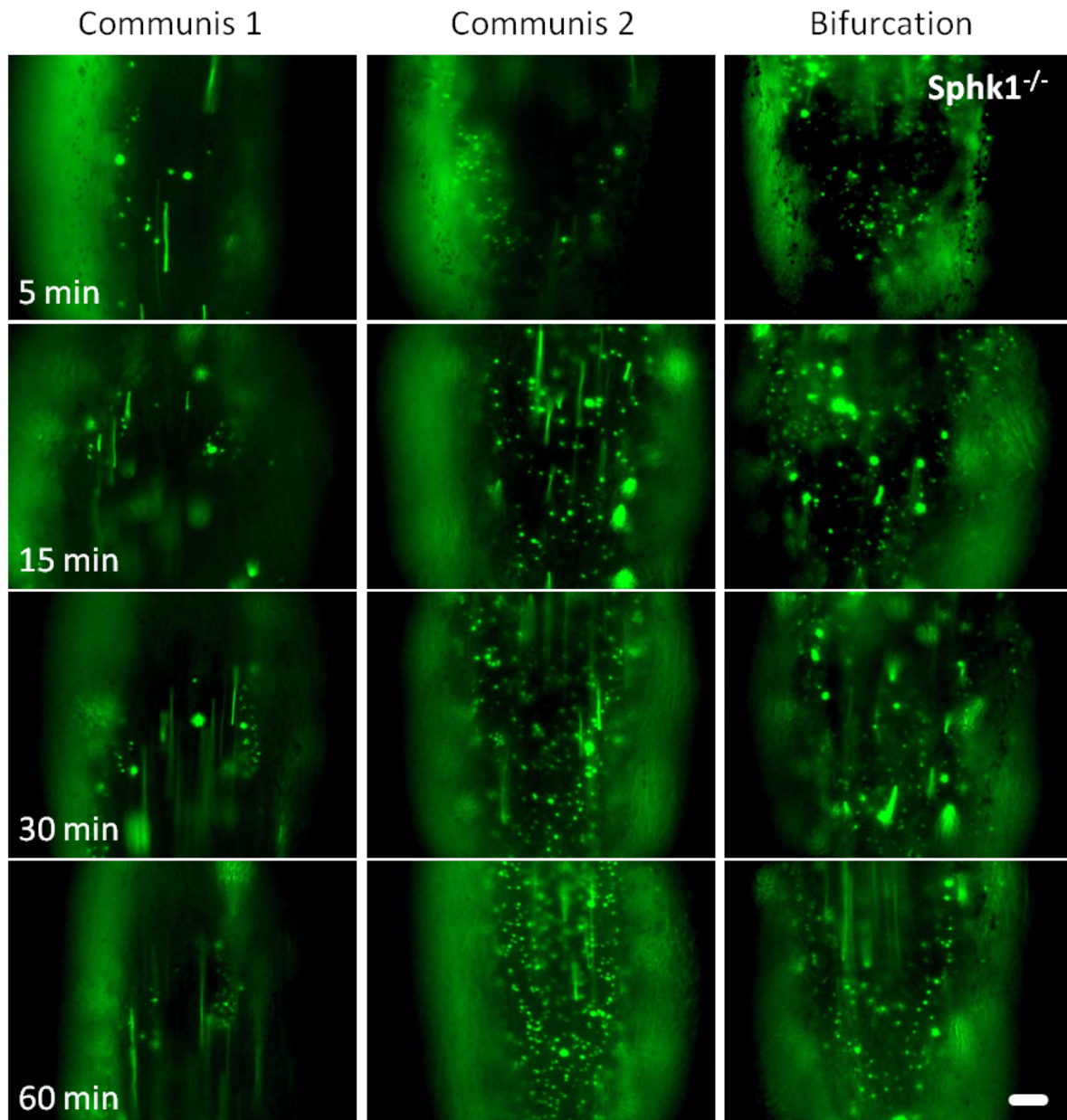


Abbildung 3.13 – Repräsentative Mikrographien nach Denudation der Arteria Carotis Communis einer SphK1-defizienten-Maus nach 5, 15, 30 und 60min. Eine Zunahme der Thrombozytenadhäsion im zeitliche Verlauf ist ersichtlich, während kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen detektiert werden kann. CFDA-SE markierte Thrombozyten sind grün dargestellt. Scalebar= $50\mu m$.

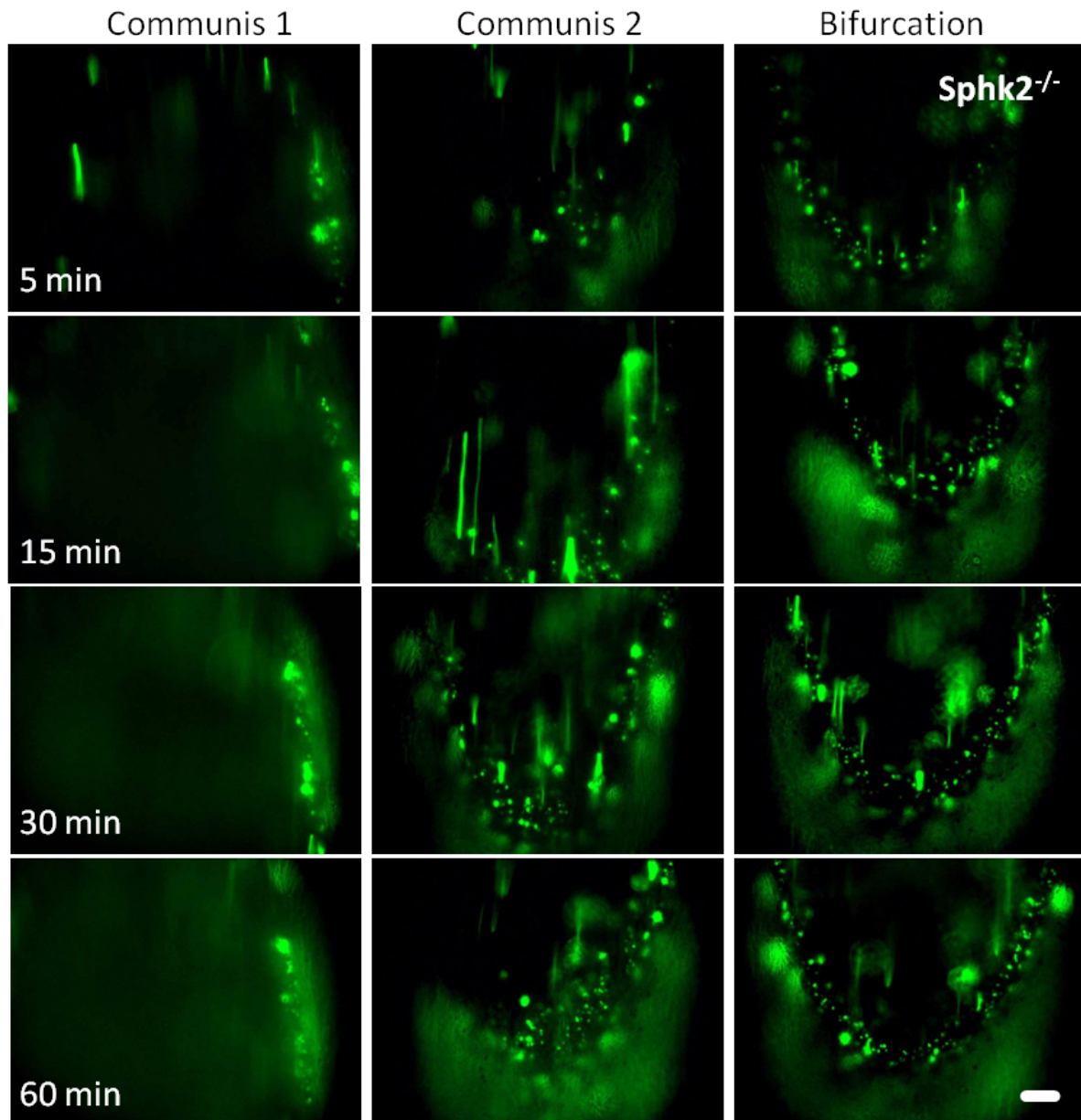


Abbildung 3.14 – Repräsentative Mikrographien nach Denudation der Arteria Carotis Communis einer SphK2-defizienten-Maus nach 5, 15, 30 und 60min. Eine Zunahme der Thrombozytenadhäsion im zeitliche Verlauf ist ersichtlich, während kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen detektiert werden kann. CFDA-SE markierte Thrombozyten sind grün dargestellt. Scalebar= $50\mu m$.

3.6 SphK2-defiziente Thrombozyten zeigen eine verminderte Aggregation im Vollblut und eine reduzierte Thrombusformation in einem Mausmodell der Eisen(III)-chlorid-Gefäßläsion in vivo

Infolge der primären Adhäsion von Thrombozyten in Bereichen von Gefäßläsionen, kommt es im Rahmen der primären Hämostase zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten und dem damit verbundenen Wachstum eines Thrombus. Dieser von der initialen Adhäsion unabhängige Prozess wird auch Thrombozytenaggregation bezeichnet und stellt eine weitere essentielle Thrombozytenfunktion dar. Die Aggregationsfähigkeit des SphK1- und SphK2-defizienten Vollblutes wurde nach Kollagen- oder ADP-Stimulation mittels Impedanzaggregometrie gemessen und mit der Wildtypkontrolle verglichen. Nach Initialisierung der Aggregation mittels Kollagen, zeigt sich weder im SphK1- noch im SphK2-defizienten Vollblut eine signifikante Veränderung (Abbildung 3.15). Hingegen kommt es nach Initialisierung mit ADP zu einer signifikanten Verminderung der Aggregation SphK2-defizienten Vollblutes im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Abbildung 3.15). Das SphK1-defiziente Vollblut zeigt auch bei ADP Aktivierung keinen signifikanten Unterschied zur Wildtypkontrolle. Die Messung der Thrombozytenzahlen im Vollblut (siehe Abbildung 3.6) zeigen eine Reduktion in SphK2^{-/-}-Tieren. Um diesen Konzentrationsunterschied als möglichen Grund der verminderten Aggregation auszuschließen, wurde die Plättchenkonzentration der Wildtyp- und SphK1-defizienten Tiere mittels Plasmazugabe um 30% herabverdünnt und erneut die Aggregation nach ADP Zugabe gemessen. Wie Abbildung 3.16 zeigt, hat eine 30%ige Verdünnung des Vollblutes einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten in der Impedanzaggregometrie, der allerdings deutlich geringer als das Aggregationsdefizit SphK2-defizienter Tiere ausfällt. So besitzt auch das verdünnte Vollblut der Wildtyp- und SphK1-defizienten Tiere weiterhin eine signifikant höhere Aggregationsfähigkeit im Vergleich zum unverdünnten Vollblut SphK2-defizienter Tiere. Die verminderte Thrombozytenzahl in SphK2-defizienten Tieren ist somit nicht die alleinige Ursache für die verminderte Vollblutaggregation.

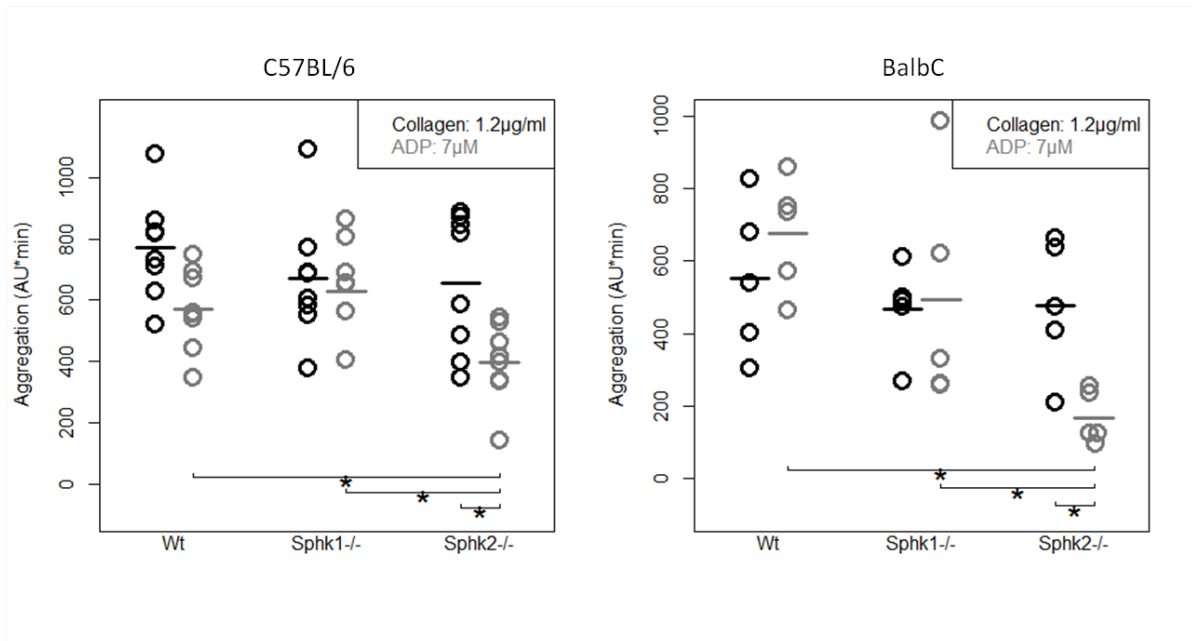


Abbildung 3.15 – Vollblutaggregation muriner Thrombozyten in der Impedanzaggregometrie. SphK2^{-/-}-Tiere zeigen eine signifikante Reduktion der Aggregation nach ADP-Aktivierung (7µM) im Vergleich zu SphK1^{-/-}- und Wildtyptieren. Das Aggregationsverhalten der SphK2^{-/-}-Tiere nach Kollagen-Aktivierung (1,2µg/ml) ist nicht beeinträchtigt. Während in SphK2^{-/-}-Tieren ein signifikanter Unterschied zwischen Kollagen- und ADP-Aktivierung messbar ist, fehlt diese Differenz in SphK1^{-/-}- und Wildtyptieren. Links sind die Aggregationsdaten auf C57BL/6-Hintergrund (n=8), rechts auf BalbC-Hintergrund (n=5) dargestellt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert aller Experimente. * = $p < 0.05$.

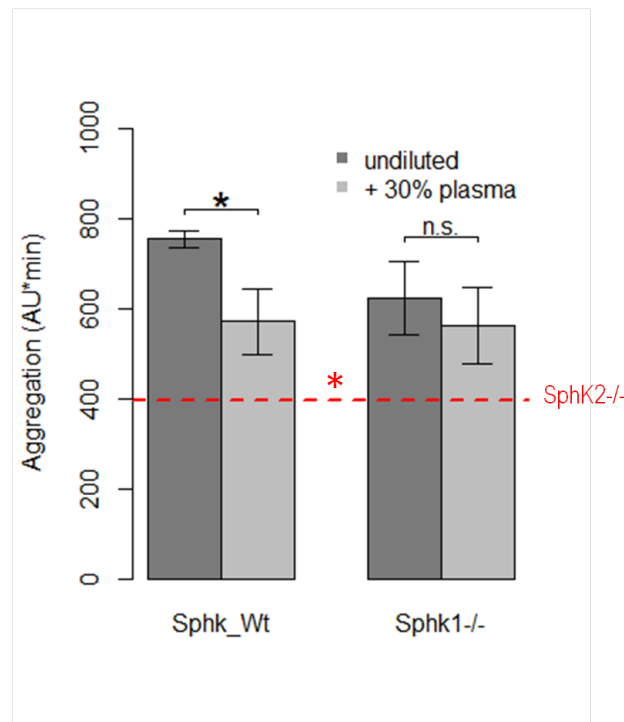


Abbildung 3.16 – Vollblutaggregation muriner Thrombozyten in der Impedanzaggregometrie nach Plasmaverdünnung. Wildtyp- und SphK1^{-/-}-Vollblut wurde mit 30% Plasma verdünnt und mit den unverdünnten Proben in der Vollblutaggregation (7 μ M ADP) verglichen. Die rote gestrichelte Linie markiert den Aggregationswert der unverdünnten SphK2^{-/-}-Probe. Die Aggregation des Sphk2^{-/-}-Vollblutes ist signifikant niedriger (ca. 20%) als der Wert des verdünnten Wildtyp- und Sphk1^{-/-}-Vollblutes. Dargestellt ist der Mittelwert und Standardfehler unabhängiger Experimente. n=5; * = $p < 0.05$; n.s. = nicht signifikant.

Um die Prozesse der Aggregation und Thrombusformation *in vivo* zu untersuchen, wurde das Modell der FeCl₃-Verletzung an der Arteria Carotis Communis verwendet. Dieses Modell führt nach Induktion des Gefäßschadens durch FeCl₃ zum thrombotischen Verschluss der Arterie, dessen zeitlicher Ablauf mittels Intravitalmikroskopie dokumentiert werden kann (siehe Abbildung 3.17). Es wurden der Verschlusszeitpunkt und die Dauer des Verschlusses registriert. Während 100% der exponierten Carotiden der Wildtyptiere komplett thrombosieren, zeigen nur 66% der SphK1-defizienten und 25% der SphK2-defizienten Tiere einen kompletten Verschluss der Gefäße (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.18, 3.19). Die mittlere Zeit bis zum Verschluss der Gefäße ist bei den SphK2-defizienten Tieren tendenziell länger (nicht signifikant) und die Zeit bis zur Wiedereröffnung des Gefäßes tendenziell kürzer (nicht signifikant) (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.19). Diese Ergebnisse können in einer „Kaplan-Meier-Überlebenskurve“ zusammengefasst werden

und sind nach Log-Rank-Testung statistisch signifikant. Dies veranschaulicht den Einfluss der SphK2 auf die Thrombusformation und -stabilität wie in Abbildung 3.18 dargestellt. Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse die steigernde Wirkung der SphK2 in der Vollblutaggregation nach ADP-Aktivierung *in vitro* und bei der Entstehung und dem Ausmaß der arteriellen Thrombose *in vivo*.

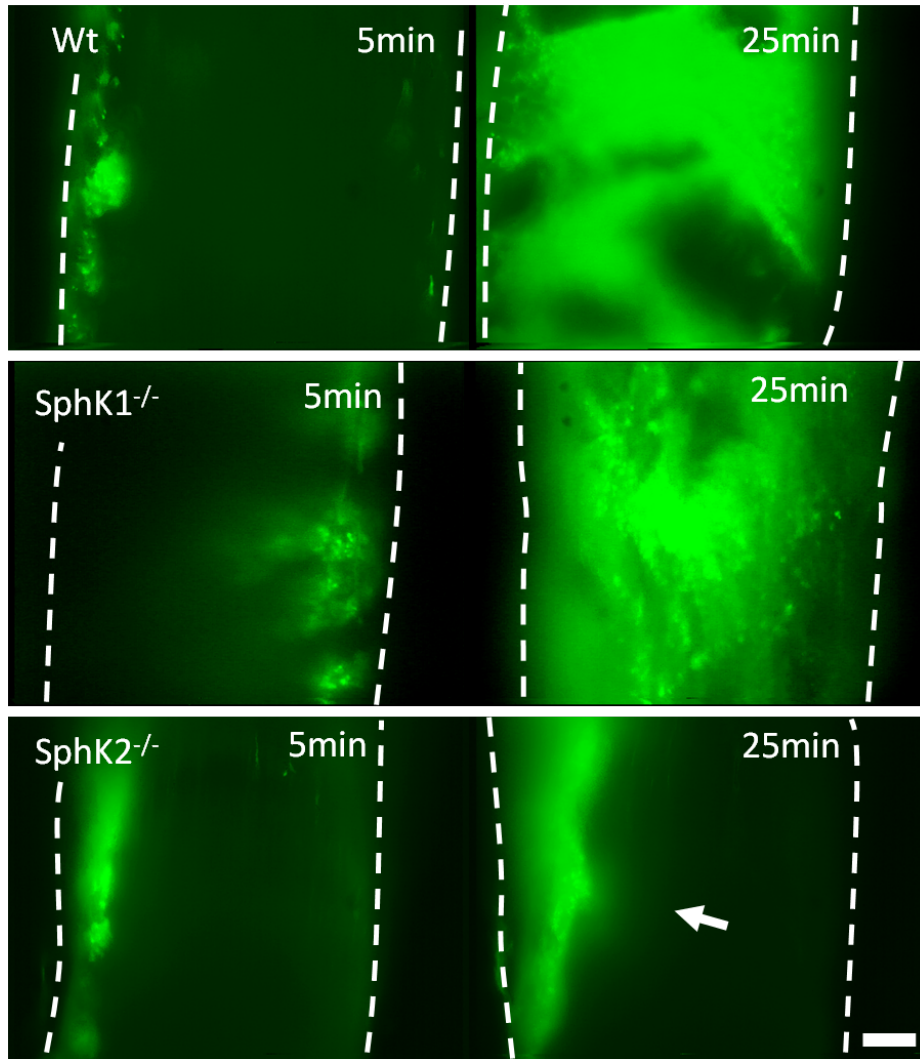


Abbildung 3.17 – Intravitalmikroskopische Mikrographien nach FeCl_3 -Verletzung von Wildtyp-Tieren und SphK1- bzw. SphK2-defizienten Tieren. Die Aufnahmen erfolgten nach 5min sowie nach 25min. Repräsentativ dargestellt ist die Trombusformation CFDA-SE-markierter Thrombozyten. Der Pfeil markiert die fehlende Okklusion der verletzten Carotis einer Sphk2-defizienten Maus. Zu diesem Zeitpunkt ist die Carotis der Mehrzahl der Wildtyp- bzw. SphK1-defizienten Tiere bereits okkludiert. Auffällig ist, dass dieser Unterschied initial (nach 5min) noch nicht zu beobachten ist. Die Adhäsion am geschädigten Endothel bzw. Subendothel ist unbeeinträchtigt. Scalebar= $50\mu\text{m}$.

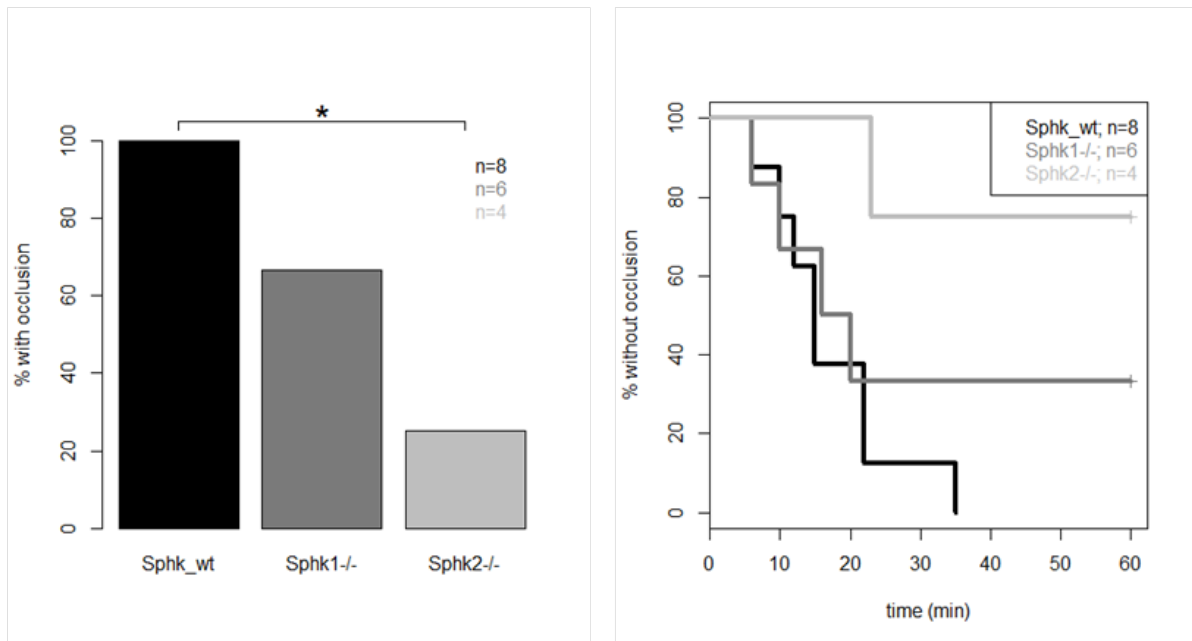


Abbildung 3.18 – Okklusionswahrscheinlichkeit SphK1- und SphK2-defizienter Tiere nach FeCl_3 -Verletzung. Links ist die Wahrscheinlichkeit dargestellt, dass ein Tier innerhalb von 60min nach FeCl_3 -Exposition eine Gefäßokklusion erleidet. SphK2-defiziente-Tiere haben ein signifikant erniedrigtes Risiko einer Gefäßokklusion.* = $p < 0.05$. Rechts ist der prozentuale Anteil der nicht okkludierten Tiere im Verlauf der 60min als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. SphK2-defiziente-Tiere zeigen im Log-Rank-Test eine signifikant erhöhte Offenheitswahrscheinlichkeit. $p < 0.05$.

strain	% of occlusion	onset (SEM)	duration (SEM)	% of reperfusion
<i>Sphk</i> ^{wt/wt}	100	17.1 (3.2)	17.4 (4.0)	87.5
<i>Sphk1</i> ^{-/-}	66.6	13.0 (3.1)	14.3 (3.6)	100
<i>Sphk2</i> ^{-/-}	25.0	23 (NA)	10 (NA)	100

Tabelle 3.1 – Messung der Gefäßokklusion im FeCl_3 -Modell der Arteria Carotis Communis. Dargestellt ist von links nach rechts die Okklusionswahrscheinlichkeit, der Beginn der Okklusion (in min), die Dauer der Okklusion (in min) und der prozentuale Anteil reperfundierter Gefäße im Vergleich der verschiedenen Gruppen. SEM=Standardfehler.

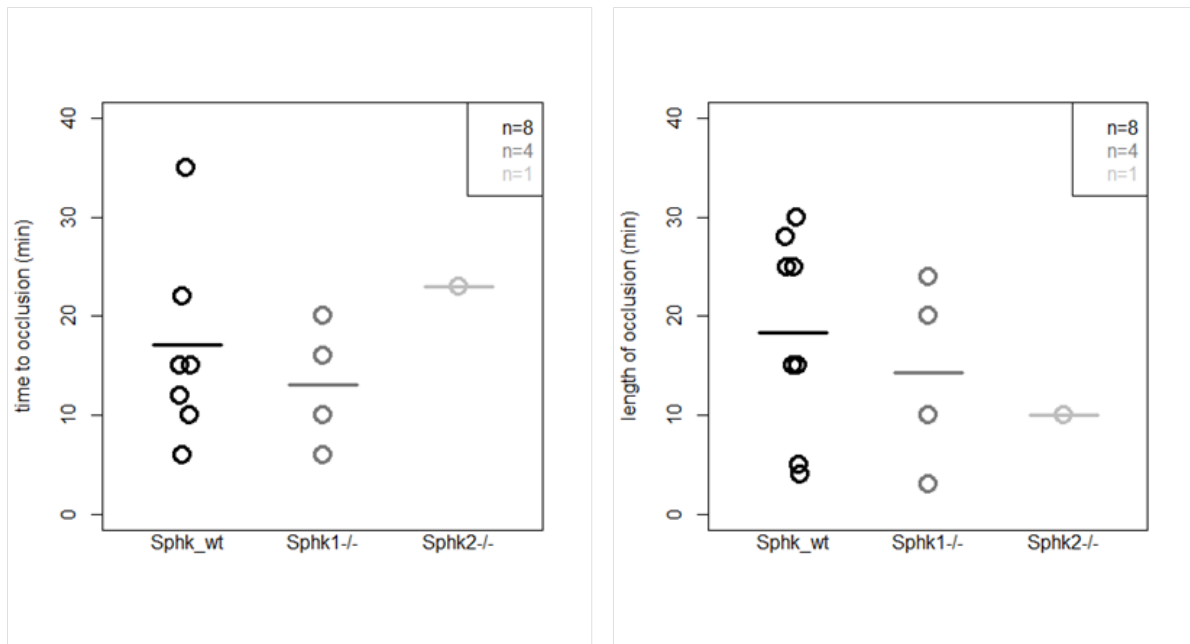


Abbildung 3.19 – Darstellung des Okklusionszeitpunktes und der Okklusionsdauer nach FeCl_3 -Verletzung. Der linke Teil der Abbildung zeigt die frühesten Zeitpunkte der vollständigen Okklusion. Es ist kein Unterschied zwischen den Gruppen detektierbar. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment. Die Querbalken zeigen die Mittelwerte an. Der rechte Teil der Abbildung stellt die Okklusionsdauer der operierten Tiere dar. Die Okklusionszeiten der verschiedenen Gruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein unabhängiges Experiment. Die Querbalken zeigen die Mittelwerte an.

4 Diskussion

SphK2 ist die dominante SphK-Isoform in Thrombozyten Es ist bereits bekannt, dass Thrombozyten eine hohe SphK-Aktivität besitzen (Ito et al., 2007). Banno et al. konnte zeigen, dass diese Aktivität hauptsächlich membranassoziiert vorliegt, aber auch im Zytosol nachweisbar ist (Banno et al., 1998). Es wurde deshalb spekuliert, dass mehrere SphK-Isoformen an der thrombozytären S1P-Produktion beteiligt sind (Banno et al., 1998; Fukuda et al., 2003). Allende et al. konnte in SphK1-defizienten Mäusen keine signifikante Reduktion der thrombozytären SphK-Aktivität detektieren, weshalb mindestens eine weitere SphK-Isoform in Thrombozyten aktiv sein muss (Allende et al., 2004). Neben der SphK1 ist bis heute nur noch eine zweite SphK-Isoform, SphK2 bekannt, deren Existenz in Thrombozyten bislang allerdings noch nicht überprüft wurde. In dieser Arbeit wurde deshalb zum ersten Mal die mögliche Rolle der SphK2 in der Bereitstellung der thrombozytären SphK-Aktivität und der damit verbundenen S1P-Produktion getestet. Als Testsystem wurde hierbei die von Zemann et al. generierte SphK2-defiziente Maus auf Balb/C-Hintergrund und die von Andrea Huwiler bereitgestellte SphK2-defiziente Maus auf C57BL/6-Hintergrund verwendet (Zemann et al., 2006; Pushparaj et al., 2009). Die Messungen der thrombozytären S1P-Spiegel dieser Tiere zeigen erstaunlicherweise eine annähernd 100%ige Reduktion im Vergleich zu SphK1-defizienten Tieren und der Wildtypkontrolle (siehe Abbildung 3.1 A). Zusätzlich kann annähernd keine SphK-Aktivität in SphK2-defizienten Thrombozyten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1 B). Diese Daten beweisen die dominante Rolle der SphK2 in der thrombozytären S1P-Produktion und zeigen, dass weder SphK1 noch eine bislang unbekannte SphK ihren Verlust kompensieren kann. Als Kontrolle der Funktionalität der verwendeten Assays wurde die intrazelluläre S1P-Konzentration in Erythrozyten der verschiedenen Gruppen getestet. In diesen Zellen führt die SphK1-Defizienz zu einem annähernd 100%igen Verlust des intrazellulären S1Ps, während die S1P-Konzentration in SphK2-defizienten Tieren unverändert bleibt (siehe Abbildung 3.2 A). Folglich ist auch die SphK-Aktivität in SphK1-defizienten Erythrozyten kaum detektierbar (siehe

Abbildung 3.2 B). Diese Kontrollexperimente entsprechen den Beobachtungen von Ito et al. (Ito et al., 2007). Bereits in unstimulierter Thrombozytensuspension ist S1P in niedrigen Mengen im Überstand nachweisbar (siehe Abbildung 3.1 B). In Einklang mit den Daten von Yatomi et al. ist die extrazellulär messbare S1P- Konzentration in Wildtyptieren nach Thrombinaktivierung gesteigert (Yatomi et al., 1997a). Ein Prozess, der einerseits durch eine Steigerung des S1P-Transports aus den Thrombozyten erklärt werden kann, andererseits aber auch durch eine stimulationsbedingte Aktivitätssteigerung der SphK2 ermöglicht werden könnte. Die Tatsache, dass Thrombozyten S1P sowohl im „Steady State“, als auch verstärkt nach Aktivierung sekretieren können, führte zur Vermutung, dass sekretiertes S1P eine wichtige Rolle in (1) der S1P-Plasmahomöostase und (2) in der Thrombozytenfunktion und Thrombusformation spielen könnte (Yatomi et al., 1995, 1997a). Die Tatsache, dass SphK2-defiziente Thrombozyten annähernd kein S1P sekretieren können, macht die SphK2^{-/-}-Maus zu einem interessanten Werkzeug, um diese Fragestellungen zu adressieren.

Rolle der SphK in der S1P-Plasmahomöostase S1P-Gradienten zwischen Plasma, Lymphe und lymphatischen Organen haben eine bedeutende Rolle in der Regulation der Immunzellwanderung (Cyster and Schwab, 2012). Die räumliche Aufrechterhaltung dieser Gradienten erfolgt sowohl durch lokalisierte S1P-Produktion, als auch durch lokalisierten S1P-Abbau (Cyster and Schwab, 2012). In SphK2-defizienten Mäusen, bei denen in INF- α/β -sensitiven Zellen zusätzlich SphK1 fehlt, ist kein plasmatisches S1P nachweisbar (Pappu et al., 2007). Da in diesen Mäusen die Auswanderung von Lymphozyten aus den lymphatischen Organen stark eingeschränkt ist und dies einen bedeutenden Einfluss auf die Funktionalität des Immunsystems hat, ist es von großem Interesse, die Regulation des Plasma-S1P-Spiegels zu verstehen (Pappu et al., 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen eine ca. 50%ige Senkung des Plasma-S1P-Spiegels in Sphk1-defizienten Tieren, bei unveränderten Plasma-S1P-Spiegeln in SphK2-defizienten Tieren (siehe Abbildung 3.3 A). Diese Messungen sind im Einklang mit bisher publizierten Daten (Allende et al., 2004; Zemann et al., 2006; Ito et al., 2007; Pappu et al., 2007). Die Tatsache, dass SphK2-defiziente Thrombozyten weder im „Steady State“, noch nach Aktivierung S1P freisetzen können (siehe Abbildung 3.1 B), und dass ein dadurch möglicher Plasma-S1P-Verlust durch die SphK1 vollständig kompensiert werden kann, schließt Thrombozyten als Hauptquelle der plasmatischen S1P-Bildung aus (siehe Abbildung 3.3 A). Dies wurde bereits von (Pappu et al., 2007) durch

die Messung normaler S1P-Plasma-Spiegel in NF-E2^{-/-}-Mäusen, die keine zirkulierenden Thrombozyten besitzen, gezeigt. Dieses Experiment konnte in vorliegender Arbeit nicht reproduziert werden. Die Messung der S1P-Plasma-Spiegel in NF-E2^{-/-}-Mäusen zeigt eine ca. 20%ige Reduktion gegenüber den Wildtyptieren, die durch Transfusion gewaschener Wildtypthrombozyten kompensiert werden kann (siehe Abbildung 3.3 B). Da die Halbwertszeit von S1P im Plasma <15min beträgt (Venkataraman et al., 2008) und die Messung der S1P-Spiegel nach Transfusion erst nach 6h erfolgten, kann davon ausgegangen werden, dass nicht im Transfusat vorhandenes, freies S1P an der Kompensation beteiligt war. Bei diesem Experiment ist allerdings zu bedenken, dass NF-E2^{-/-}-Mäuse neben einer Thrombozytopenie auch eine leichte Anämie aufweisen (Shivdasani et al., 1995). Der erniedrigte S1P-Spiegel könnte also auch auf den erythrozytären S1P-Verlust zurückzuführen sein. Nichtsdestotrotz konnte das S1P-Defizit durch Thrombozytentransfusion korrigiert werden. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass thrombozytäres S1P zwar nicht die Hauptquelle des Plasma-S1P-Spiegels darstellt, aber dass unter bestimmten hämatologischen Bedingungen, wie z.B. einer Anämie thrombozytäres S1P zu dessen Aufrechterhaltung beitragen kann.

Sphk2 spielt eine modulierende Rolle in der Regulation der Thrombozytenfunktion Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder in SphK1-, noch in SphK2-defizienten Thrombozyten unter „Steady State“-Bedingungen ein morphologischer Unterschied im Vergleich zur Wildtypkontrolle festgestellt werden. Weder die mittleren Thrombozytenvolumina (siehe Abbildung 3.5), noch die qualitative und quantitative Verteilung der intrazellulären Organellen weichen von denen der Wildtypthrombozyten ab (siehe Abbildung 3.4). Dies spricht für eine qualitativ unauffällige Thrombopoese. Hingegen sind die Thrombozytenzahlen der SphK2-defizienten Tiere im Vergleich zur Wildtypkontrolle um ca. 20-30% vermindert. Dies lässt eine quantitative Beeinträchtigung der Megakaryozytopenese oder Thrombopoese vermuten (siehe Abbildung 3.6 A und B). Um die Funktionalität dieser, morphologisch unauffälligen Thrombozyten zu untersuchen wurden eine Reihe von funktionellen Thrombozytentests, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* durchgeführt. Die Rolle von S1P in der Thrombozytenfunktion wird kontrovers diskutiert. Bisherige Daten basieren auf *in vitro* Analysen der Thrombozytenfunktion nach extrazellulärer S1P Gabe zu gewaschenen Blutplättchen, bzw. plättchenreichen Plasma (PRP). Bei diesen Versuchen konnte einerseits eine Steigerung der Plättchenaggregation (Yatomi et al., 1995; Randriamboavonjy et al., 2009), andererseits aber auch eine Abnahme

bzw. unveränderte Aggregation beobachtet werden (Ulrych et al., 2011; Nugent and Xu, 2000). Eine Erklärung für die verschiedenen Ergebnisse könnte die jeweils unterschiedliche Art der Plättchenpräparation, und die damit verbundenen unterschiedlichen Versuchsbedingungen darstellen. In der Tat ist der Einfluss des extrazellulären Milieus auf das S1P-Signalling z.B. in Lymphozyten bereits bekannt und entscheidender Bestandteil in der Regulation des Lymphozytentrackings. Hohe extrazelluläre S1P Spiegel z.B. in Lymphe und Plasma führen zu einer Internalisierung der S1P1 Rezeptoren, während niedrigere interstitielle S1P-Spiegel zu einer Oberflächenexpression von S1P1 auf diesen Zellen führen. Dies ermöglicht u.a. die S1P-abhängige gerichtete Auswanderung der Lymphozyten aus dem Lymphknoten in den Blutkreislauf (Cyster and Schwab, 2012). Die Regulation der S1P-Rezeptoren auf Thrombozyten ist nicht untersucht, könnte aber in unterschiedlichen Versuchsaufbauten eine Ursache für abweichende Ergebnisse darstellen. Gerade deshalb ist es wichtig, reproduzierbare, physiologische Versuchsbedingungen zu verwenden, um einen möglichen systematischen Fehler zu vermeiden. Das verwendete Versuchsdesign zeigt hierbei folgende Vorteile:

(1) Die Erkenntnis, dass SphK2 die entscheidende SphK-Isoform in Thrombozyten darstellt (siehe Abbildung 3.1 A), und dass ohne SphK2-Aktivität keine S1P-Freisetzung aus Blutplättchen möglich ist (siehe Abbildung 3.1 B), ermöglicht erstmals die Untersuchung des thrombozytär sekretierten S1Ps auf die Thrombozytenfunktion ohne artifizielle, extrazelluläre Gabe von S1P. (2) Des weiteren wurde bei den dargestellten *in vitro* Daten darauf geachtet, die Thrombozytenfunktion in ihrer physiologischen Umgebung, dem unveränderten Vollblut zu untersuchen. (3) Schließlich erlaubt das verwendete Mausmodell erstmals die Evaluation der Rolle der thrombozytären S1P-Bildung in der Thrombusformation *in vivo*.

Auf dem Weg zur Bildung fester, wandständiger Thromben an Orten von Gefäßläsionen, müssen Thrombozyten verschiedene Aufgaben erfüllen, die den unterschiedlichen Stadien der Thrombusentwicklung zugeordnet werden können. So kommt es als erstes zur Rekrutierung inaktivierter, im Blutkreislauf zirkulierender Thrombozyten an den Ort der geschädigten Gefäßwand. Dies geschieht in einem Prozess, der als „Tethering“ und „Rolling“ bezeichnet wird und mit der festen Adhäsion der Thrombozyten am Endotheldefekt endet (Denis and Wagner, 2007). Auf molekularer Ebene kommt es hierbei zur rezeptorvermittelten Bindung der Thrombozyten an extrazelluläre Matrixproteine (Savage et al., 1996; Massberg et al., 2002; Bergmeier et al., 2006). Diese Bindung führt einerseits zur Immobilisation am Ort der Verletzung, andererseits kommt es durch sogenanntes „Outside-

In Signalling“ zu Aktivierung der Thrombozyten (Li et al., 2010). Besonders wichtig ist hierbei die GPVI vermittelte Bindung an Kollagen und die GPIb-V-IX vermittelte Bindung an von Willebrandfaktor (vWF), die resistent gegen hohe Scherraten ist (Savage et al., 1996; Massberg et al., 2002). Um einen möglichen Einfluss der SphK2 in Thrombozyten auf diese initialen Prozesse der Thrombusformation zu untersuchen, wurde ein Flusskammerexperiment mit Perfusion SphK2-defizienter Mausthrombozyten über immobilisierte Matrixproteine durchgeführt. Weder der Vergleich der SphK2-defizienten Thrombozyten mit der Wildtyp-Kontrolle, noch der Vergleich mit SphK1-defizienten Mäusen zeigt einen signifikanten Unterschied des Adhäsionsvermögens (siehe Abbildung 3.8). Während auf Kollagen und vWF in allen Gruppen eine gute Adhäsion beobachtet werden kann, ist diese bei Fibrinogen und Laminin vermindert. Dies ist auf die unterschiedliche Adhäsivität dieser Substrate unter Flussbedingung zurückzuführen (Schulz et al., 2009). Die Detektion dieser Substrat-spezifischen Unterschiede beweist die Funktionalität der Thrombozyten nach Präparation der Perfusionslösung in unserem Modell. Um die Thrombozytenfunktion SphK2-defizienter Tiere *in vivo* zu untersuchen, wurde die von Lindner et al. publizierte Methode der mechanischen Endotheldenudation durchgeführt und intravitalmikroskopisch analysiert. Hierbei wird mittels eines intraluminale eingebrachten Drahtes das Endothel der Arteria Carotis Communis mechanisch entfernt, was zur Freilegung der subendothelialen Matrix führt (Lindner et al., 1993; Massberg et al., 2002). Dieses Modell in der Kombination mit intravitraler Mikroskopie ermöglicht die optische Darstellung der Thrombozytenadhäsion *in vivo* (Massberg et al., 2002). Die Quantifizierung der intravitralen Mikrographien konnte keinen signifikanten Unterschied in der Thrombozytenadhäsion SphK2-defizienter Tiere zeigen (siehe Abbildung 3.11). Kritisch zu betrachten ist hierbei die hohe Schwankung der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen (siehe Abbildung 3.11 und Anhang). Dies ist auf die Schwierigkeit zurückzuführen, trotz standardisierten Versuchsprotokolls eine, in der Intensität reproduzierbare Verletzung zu erzeugen. Es wäre also möglich, dass potentielle Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen, die feiner als die präparationsbedingten Schwankungen sind, nicht detektiert werden können. Der Einfluss der SphK2 auf die Thrombozytenadhäsion wäre dann allerdings nur von sehr geringer Bedeutung. Mit den *in vitro*-Flusskammerexperimenten zusammengefasst, zeigen diese Daten erstmals, dass SphK2 keinen bedeutenden Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit muriner Thrombozyten *in vitro* und *in vivo* hat. Somit kann davon ausgegangen werden, dass weder intrazelluläres S1P als „Secondmessenger“, noch von Thrombozyten sekretiertes extrazelluläres S1P bei der Thrombozytenadhäsion eine entscheidende Rolle spielt.

In Folge der Adhäsion kommt es zum sogenannten „Outside-In Signalling“ und zur weiteren Aktivierung der Thrombozyten. Dabei werden u.a. Oberflächenrezeptoren, sogenannte Integrine, wie $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ aktiviert, die für die feste Thrombozyten-Matrix-Interaktion verantwortlich sind (Li et al., 2010). Neben der Aktivierung dieser Oberflächenrezeptoren kommt es des weiteren zur Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren, mit großer Bedeutung für die Thrombozytenfunktion und Thrombusformation (King et al., 2009; Blair and Flaumenhaft, 2009). Dieser Vorgang wird Thrombozytensekretion bezeichnet und beschreibt die Exozytose granulärer Zellbestandteile (Holmsen and Weiss, 1979). Gleichzeitig kommt es auch zum transmembranösen Transport neu synthetisierter Signalmoleküle, wie Thromboxan A_2 . So wird z.B. in Folge der kollageninduzierten GPVI Aktivierung die Freisetzung von ADP aus „Dense Granula“ und die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten wie Thromboxan A_2 und Prostaglandin E_2 gefördert (Nieswandt and Watson, 2003). Neben der Matrix-vermittelten Thrombozytensekretion löst auch die Bindung des im Bereich der Läsion gebildeten Thrombins an die Rezeptoren PAR1 und PAR4 (in der Maus PAR3 und PAR4) eine potente Freisetzungsreaktion aus (Kahn et al., 1999). Die hier dargestellten Daten und andere Publikationen konnten zeigen, dass die Bildung und Freisetzung von S1P aus Thrombozyten durch Thrombinaktivierung gesteigert werden kann (siehe Abbildung 3.1 B) (Yatomi et al., 1997a). Des weiteren belegen unsere Daten, dass hierbei SphK2 die Quelle des freigesetzten thrombozytären S1Ps darstellt (siehe Abbildung 3.1). Ob S1P als extrazellulärer Ligand, oder als intrazellulärer „Secondmessenger“ eine Rolle bei der Thrombozytensekretion spielt wurde bislang nicht untersucht. Um einen möglichen Einfluss der SphK2 auf die Thrombozytensekretion zu untersuchen, wurden deshalb isolierte Thrombozyten mit Thrombin stimuliert und die Konzentrationen bestimmter Mediatoren in den Überständen gemessen. Als Marker für die Freisetzung der „Dense Granula“ wurde hierbei ATP gemessen. Repräsentativ für die Bildung der Arachidonsäuremetabolite erfolgte die Thromboxan B_2 (TXB₂) und Prostaglandin E_2 (PGE₂) Detektion. Unsere Daten zeigen eine unveränderte ATP-Freisetzung SphK2-defizienter Tiere im Vergleich zur Wildtypkontrolle, was für eine unbeeinträchtigte „Dense Granula“-Sekretion spricht (siehe Abbildung 3.7 A). Hingegen findet sich bei der Bildung der Arachidonsäuremetabolite TXB₂ und PGE₂ eine deutliche Reduktion im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 3.7 C und D). Ein ähnlicher Einfluss von S1P auf die Induktion von COX2 und die Bildung von PGE2 konnte bereits in TNF α stimulierten Fibroblasten gezeigt werden (Pettus et al., 2003). Die hierfür verantwortliche SphK-Isoform war allerdings SphK1. Unbeantwortet bleibt die Frage, ob die SphK-abhängige Regulation des Arachidonsäuremetabolismus durch

intrazelluläres S1P, im Sinne eines „Secondmessengers“ oder als extrazelluläres, sekretiertes S1P durch die Bindung an $G_{\alpha q}$ gekoppelte S1P-Rezeptoren erfolgt. Auch die durch den Verlust der SphK2 akkumulierenden Metabolite Sphingosin und Ceramid könnten einen Effekt auf den Arachidonsäuremetabolismus haben.

Als Folge der Thrombozytensekretion kommt es zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten in den wachsenden Thrombus (Offermanns, 2006). Dabei werden diese durch die freigesetzten Mediatoren aktiviert und treten mit bereits adhärenenten Thrombozyten vorwiegend über Fibrinogenbrücken in Kontakt. Dieser Prozess wird als Aggregation bezeichnet und ist abhängig von der Aktivierung des Schlüsselmoleküls $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Massberg et al., 2005). Man unterscheidet schwache (wie z.B. ADP) von starken Aggregationsstimuli (wie z.B. Kollagen) (Zhou and Schmaier, 2005). Diese Unterscheidung basiert vor allem auf der Fähigkeit der Agonisten eine suffiziente Thrombozytensekretion, mit persistenter $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung zu induzieren (Zhou and Schmaier, 2005). Fibrilläres Kollagen bindet auf Thrombozyten an den Rezeptorkomplex GPVI-FcR γ und führt zur Aktivierung der daran gekoppelten Tyrosinkinasekaskade. Im folgenden „Inside-Out Signalling“ kommt es einerseits zur Aktivierung des kollagenspezifischen Integrins $\alpha_2\beta_1$ und der für die Aggregation bedeutsamen Freisetzung der „Secondary Mediators“ ADP und TXA₂ (Nieswandt and Watson, 2003). ADP und TXA₂ führen ihrerseits zur Aktivierung von „G-Protein Coupled Receptors“ (GPCRs) die eine Vielzahl von Signalwegen induzieren und zur vollständigen Aktivierung der Thrombozyten führen können (Offermanns, 2006). TXA₂ aktiviert dabei $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha_{12/13}}$ gekoppelte Signalwege, während ADP $G_{\alpha q}$ und G_{α_i} vermittelt agiert (Offermanns, 2006). Während der starke Agonist Kollagen also eine Vielzahl von Signalwegen direkt über GPVI-FcR γ bzw. indirekt über „Second Mediator“ induziert, bewirkt die alleinige Gabe von ADP lediglich die Aktivierung der $G_{\alpha q}$ und G_{α_i} vermittelten Signalwege. Moers et al. konnte in einem Mausmodell zeigen, dass der Verlust von $G_{\alpha_{12/13}}$ zu einer verminderten Aktivierung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ und dadurch zur beeinträchtigten Thrombozytenaggregation *in vitro* und *in vivo* führt (Moers et al., 2003). Das Fehlen der $G_{\alpha_{12/13}}$ Aktivierung nach ADP-Stimulation erklärt, dass dieser schwache Agonist in niedrigen Konzentrationen nur eine geringe, reversible Aggregationsreaktion auslöst (Zhou and Schmaier, 2005). Mit Steigerung der ADP-Konzentration kann dieses Aggregationsdefizit kompensiert werden, was u.a. dadurch erklärt werden kann, dass es bei höheren ADP Konzentrationen zur Steigerung der TXA₂ Produktion und folglich zur zusätzlichen $G_{\alpha_{12/13}}$ Aktivierung kommen kann (Jin et al., 2002). Die meisten in der Literatur vorhanden Daten bezüglich der Rolle von S1P auf die Thrombozyten-

funktion basieren auf *in vitro* Aggregationsexperimenten, wobei sich die verwendeten Versuchsprotokolle deutlich unterscheiden (Yatomi et al., 1995; Nugent and Xu, 2000; Randriamboavonjy et al., 2009; Ulrych et al., 2011). Die hier dargestellten Daten basieren auf der Methode der Impedanzaggregometrie, die eine Messung der Aggregation im unveränderten Vollblut ermöglicht (Cardinal and Flower, 1979b,a; Sibbing et al., 2008). Während nach Gabe des starken Agonisten Kollagen kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden kann, zeigt sich bei Aktivierung mit niedrigen ADP-Konzentrationen eine verminderte Aggregation SphK2-defizienter Thrombozyten im Vollblut (siehe Abbildung 3.15). Diese Beobachtung könnte durch drei Mechanismen erklärt werden. (1) Einerseits könnte die verminderte Thromboxanbildung und die dadurch verminderte Amplifikationsreaktion der Plättchenaktivierung ursächlich für die geringere Aggregation sein (2) Andererseits könnte die fehlende S1P Freisetzung aus SphK2-defizienten Thrombozyten und die damit verbundene, niedrigere lokale extrazelluläre S1P Konzentration zu einem Thromboxan-unabhängigen, für die Aggregation benötigten Verlust der S1P-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion führen. (3) Des Weiteren könnten Thrombozyten unabhängige SphK2-Effekte an der verminderten Aggregation beteiligt sein. Die erste Hypothese könnte durch Inhibition der thrombozytären Thromboxan A_2 -Synthese, z.B mittels Indomethacin belegt werden. Ist nach Indomethacingabe weiterhin eine unterschiedliche Aggregation der SphK2-defizienten Tiere zu beobachten, so wäre dieser Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf die Thromboxansynthese zurückzuführen. Die zweite Hypothese steht im Einklang mit Yatomi et al., die einen Synergismus zwischen niedrig konzentrierten ADP und der extrazellulären S1P-Gabe beobachten konnten (Yatomi et al., 1995). Die verminderte Aggregation der SphK2-defizienten Tiere wäre somit gut durch die erniedrigte thrombozytäre S1P-Freisetzung und dessen parakrine- bzw. autokrine Signalübertragung zu erklären. Auch S1P bindet an GPCRs (S1PR₁₋₅). Randriamboavonjy et al. und Motohashi et al. konnten die Expression von S1PR₂ bzw. mRNA des S1PR₄ auf Thrombozyten nachweisen (Randriamboavonjy et al., 2009; Motohashi et al., 2000). S1PR₂ transduziert über den $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ und $G_{\alpha 12/13}$ Signalweg, während S1PR₄ $G_{\alpha i}$ und $G_{\alpha 12/13}$ abhängig ist. Eine Vielzahl der Thrombozytenfunktionen werden über G-Protein gekoppelte Signalwege reguliert und synergistische Effekte von S1P mit bekannten „Second Mediators“ wie ADP sind dadurch gut zu erklären. Zu bedenken ist auch die dritte genannte Möglichkeit. Da es sich bei den Sphk2-defizienten Mäusen nicht um einen zellspezifischen „Knock-out“ handelt, müssen bei Untersuchung des Vollblutes auch die weiteren zellulären Blutkomponenten berücksichtigt werden. Wie unsere Daten (siehe Abbildung 3.2) zeigen, ist

die SphK2-Aktivität in Erythrozyten vernachlässigbar gering und ein Fehlen dieser Isoform erklärt nicht das beobachtete Aggregationsdefizit. Diehl et al. konnten eine Rolle der neutrophilen Granulozyten in der ADP-induzierten humanen Vollblutaggregation zeigen (Diehl et al., 2010). Auch die Expression der SphK2 konnte in murinen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, wodurch ein Einfluss dieser Zellpopulation in den dargestellten Aggregationsexperimenten denkbar ist (Zemann et al., 2007). Dagegen spricht allerdings, dass eine Immunodepletion der Neutrophilen- und Monozyten keinen Einfluss auf die Aggregation des murinen Vollblutes hat (nicht publizierte Beobachtung aus unserem Labor). Des Weiteren konnte Zemann et al. zeigen, dass sowohl SphK1-, als auch SphK2-defiziente Tiere eine normale Neutrophilenfunktion zeigen (Zemann et al., 2007). Lymphozyten besitzen nur eine sehr geringe SphK-Aktivität (Schwab et al., 2005) und sind bei der Vollblutaggregation nicht von Bedeutung, weshalb auch diese Zellpopulation zu vernachlässigen ist (Rinder et al., 1991). Die beobachtete Aggregationsminderung im SphK2-defizienten Vollblut ist somit mit großer Wahrscheinlichkeit auf die fehlende SphK2-Aktivität in Thrombozyten zurückzuführen. Einen 100%igen Beweis würde allerdings nur die Wiederholung der Experimente mit dem Vollblut einer Megakaryozyten/Thrombozyten-spezifischen SphK2-deletierten Maus erbringen.

Während die synergistische Funktion des S1Ps in der Plättchenaggregation *in vitro* bereits charakterisiert wurde, konnte eine Relevanz dieser Befunde *in vivo* bisher noch nicht gezeigt werden (Yatomi et al., 1995). Für die Analyse der Plättchenaggregation und Thrombusformation *in vivo* wurde in dieser Arbeit das Modell der FeCl₃ Verletzung an der Arteria Carotis Communis verwendet. Dieses Thrombosemodell wurde von Kurz et al. in Ratten etabliert und ist seither ein gängiges Thrombosemodell in der kardiovaskulären Forschung. Morphologisch entstehen hierbei okklusive Thromben, die reich an Thrombozyten, Fibrin und auch an Erythrozyten sind (Kurz et al., 1990). Mechanistisch wurde lange Zeit vermutet, dass es über direkte oxidative Effekte auf das Endothel zur Denudation der Gefäßwand und zur Freilegung der subendothelialen, extrazellulären Matrix kommt. Interessanterweise konnte Woollard et al. zeigen, dass diese direkten Effekte des FeCl₃ *in vivo* eine untergeordnete Rolle spielen. Vielmehr führt FeCl₃ zur Hämolyse der vorbeifließenden Erythrozyten, deren freigesetztes, durch FeCl₃ oxidiertes Hämoglobin hauptsächlich an der Schädigung des Endothels beteiligt ist (Woollard et al., 2009). Das Ausmaß des hierbei entstehenden Schadens ist konzentrationsabhängig (Kurz et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurden intermediäre Konzentrationen von 10%iger FeCl₃ verwendet, die im Wildtyp nach ca. 10-20min (siehe

Abbildung 3.19) zur Okklusion des Gefäßes führen. Dies ist im Einklang mit den von Fay et al. publizierten Daten (Fay et al., 1999). Während die SphK1-defizienten Tiere eine vergleichbare Kinetik wie die Wildtypkontrolle zeigen, kommt es bei SphK2-defizienten Tieren nur in 25% der Fälle zur vollständigen Okklusion (siehe Abbildung 3.18). Der Zeitpunkt der Okklusion ist hierbei etwas später, und die Dauer etwas kürzer als beim Durchschnitt der Kontrolltiere (siehe Abbildung 3.19). Auch die Kaplan-Meier-Analyse der okklusionsfreien Zeitintervalle zeigt einen signifikanten Vorteil der SphK2-defizienten Mäuse gegenüber den Kontrolltieren innerhalb von 60min, nach Induktion des Schadens einen Gefäßverschluss zu erleiden (siehe Abbildung 3.18). Diese Daten zeigen zum ersten Mal die Bedeutung der SphK2 in der Thrombusformation *in vivo*. Während es im Denudationsmodell nur selten zum Verschluss des Gefäßes kommt (nicht publizierte Beobachtung), zeigen im FeCl₃-Modell 100% der Wildtyptiere eine Okklusion. Dies ist durch den unterschiedlichen Mechanismus der Thrombusentstehung zu erklären. In der Drahtdenudation stellt die freigelegte subendotheliale Matrix den primären Aktivierungsreiz der Thrombozyten dar. Hingegen kommt es neben der Denudation des Endothels, wie durch Woollard et al. gezeigt, bei der FeCl₃ auch zur Schädigung der vorbei fließenden Blutzellen (Woollard et al., 2009). Die hierbei hämolysierenden Erythrozyten spielen bei der Schadensentstehung eine besondere Rolle. Während der entscheidende Einfluss des oxidierten Hämoglobins durch Woollard et al. gezeigt werden konnte, könnten auch weitere durch Erythrozyten freigesetzte Stoffe die Thrombose fördern. Ein wichtiger Thrombozytenagonist, der von hämolysierten Erythrozyten freigesetzt wird ist z.B. ADP. In der Tat konnte Cornelissen et al. zeigen, dass neben einem Thrombin abhängigen Aggregationsmechanismus auch ein Thrombin unabhängiger, ADP abhängiger Mechanismus an der Thrombusentstehung im FeCl₃ Modell beteiligt ist (Cornelissen et al., 2010). So waren Mäuse, denen der ADP-Rezeptor P2Y₁₂ fehlt nach 8%iger FeCl₃-Applikation vor Gefäßokklusion geschützt (Cornelissen et al., 2010). Hierbei spielt einerseits das, von Thrombozyten freigesetzte ADP eine entscheidende Rolle (King et al., 2009). Andererseits könnte aber auch erythrozytär freigesetztes ADP zur zusätzlichen Aktivierung und Rekrutierung weiterer Thrombozyten mit konsekutivem Gefäßverschluss führen. Da SphK2-defiziente Thrombozyten eine verminderte Aggregation nach Stimulation mit ADP zeigen, wäre dies eine mögliche Erklärung der geringeren Okklusionswahrscheinlichkeit im FeCl₃-Modell *in vivo*. Auch die Tatsache, dass in SphK2-defizienten Tieren nach FeCl₃-Schädigung Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand adhären (siehe Abbildung 3.17) zeigt, dass es sich primär um einen Aggregationsdefekt bei erhaltener Adhäsionsfähigkeit handelt.

Zusammenfassend zeigt die funktionelle Thrombozytentestung einen Aggregationsdefekt SphK2-defizienter Thrombozyten im Vollblut und in der FeCl₃-Gefäßwandverletzung der Arteria Carotis Communis bei unbeeinträchtigtem Adhäsionsverhalten. Folgende Mechanismen könnten hierbei beteiligt sein. (1) Die Beobachtung, dass SphK2-defiziente Thrombozyten kein S1P sekretieren und demzufolge die extrazelluläre S1P-Konzentration in der Umgebung eines wachsenden Thrombus denkbar gering ist, könnte eine Erklärung für die eingeschränkte Thrombozytenfunktion darstellen. S1P könnte somit als extrazellulärer Ligand an thrombozytäre S1P-Rezeptoren binden und wichtige Signalwege für die suffiziente Aggregatbildung induzieren. (2) Da unsere Daten eine intrazelluläre Rolle des S1Ps als „Second messenger“ allerdings nicht ausschließen, sind weitere Studien notwendig um diese Frage zu beantworten. (3) Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Rolle der SphK2 in der Bildung von Arachidonsäuremetaboliten gezeigt werden. Welchen Anteil dieser Mechanismus zu dem beobachteten Aggregationsdefizit beiträgt muss zukünftig noch geklärt werden.

Auch die Frage ob SphK2 ein geeignetes Zielmolekül für die Thrombozytenhemmung im Menschen darstellt muss durch zukünftige Untersuchungen beantwortet werden. Problematisch war bislang die Möglichkeit einer selektiven Hemmung der SphK2-Isoform. Dies wurde kürzlich mit der Entdeckung der Substanz ABC294640 [3-(4-chlorophenyl)-adamantane-1-carboxylic acid (pyridin-4-ylmethyl)amide] erstmals möglich. French et al. zeigten in ihrer Studie eine konzentrationsabhängige Selektivität gegenüber der SphK1-Isoform und anderer Proteinkinasen (French et al., 2010). Sie konnten eine antiproliferative und antimigratorische Wirkung in einer Reihe von Tumorzelllinien *in vitro* zeigen. Die günstige Pharmakokinetik und -dynamik, sowie die niedrige Toxizität von ABC294640 ermöglichten des weiteren eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums in einem Brustkrebs-Xenograft-Modell der Maus *in vivo* nach oraler Applikation. Diese Daten konnten durch weiteren Studien untermauert werden, weshalb ABC294640 augenblicklich in einer klinischen Studie (Phase 1) in der Tumorthherapie an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren getestet wird (Beljanski et al., 2011; Gao et al., 2012). Die in vorliegender Arbeit dargestellten Ergebnisse stellen die wissenschaftliche Grundlage für eine mögliche antithrombotische Wirkung von ABC294640. Weitere Studien müssen die Wirkung von ABC294640 auf die Thrombozytenfunktion charakterisieren. Schließlich bleibt abzuwarten, ob die Inhibition der SphK2, einem bedeutenden Regulator einer Vielzahl physiologischer Prozesse, mit einem akzeptablen Nebenwirkungsspektrum vereinbar ist.

5 Zusammenfassung/Summary

Hintergrund Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Thrombose und Hämostase. Ihre Aktivierung im Bereich von Gefäßverletzungen verhindert lebensbedrohliche Blutungen und fördert die Wundheilung. Hingegen kann die Thrombusbildung aktivierter Thrombozyten im Rahmen von Gefäßerkrankungen zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Herzinfarkt und Schlaganfall führen. Sphingosinkinase 1 und 2 (SphK 1 und 2) sind Isoenzyme des Sphingolipidmetabolismus, die die Phosphorylierung von Sphingosin (Sph) in das bioaktive Sphingosin-1-Phosphat (S1P) katalysieren. S1P kann sowohl als extrazellulärer Ligand der fünf G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren (S1PR1-5), wie auch als intrazellulärer Secondmessenger fungieren. Obwohl Thrombozyten beide SphK Isoformen exprimieren und nach Stimulation große Mengen S1P freisetzen, bleibt die (patho-)physiologische Rolle thrombozytären S1Ps bisweilen ungeklärt. Vorliegende Arbeit befasst sich deshalb mit der Rolle der SphK 1 und 2 in der Regulation der Thrombozytenfunktion.

Ergebnisse SphK2-defiziente Mäuse zeigen im Vergleich zu SphK1-defizienten- und Wildtyptieren eine ca. 100fache Reduktion der intrazellulären, thrombozytären S1P-Spiegel. Des Weiteren können SphK2-defiziente Thrombozyten nach Thrombinstimulation kein S1P in den Überstand sezernieren. Dies zeigt, dass SphK2 die dominierende Isoform in Thrombozyten darstellt und für die Bildung und Freisetzung von S1P verantwortlich ist. Interessanterweise ist die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten nach Thrombinaktivierung in SphK2-defizienten Thrombozyten im Vergleich zur Wildtypkontrolle vermindert. Die funktionelle Analyse SphK2-defizienter Thrombozyten zeigt eine signifikante Beeinträchtigung der Aggregation bei erhaltenem Adhäsionsvermögen. Im Einklang hiermit, ist das Ausmaß der Thrombusformation *in vivo* nach Eisen-3-Chlorid-Gefäßschädigung in SphK2-defizienten Mäusen signifikant vermindert.

Schlussfolgerung SphK2 ist die dominierende Isoform in Thrombozyten. Sie ist für die Bildung von thrombozytärem S1P verantwortlich und fördert die Thrombozytenag-

gregation und Thrombusformation. Im Einklang hiermit sind SphK2-defiziente Mäuse nach Eisen-3-Chlorid-Gefäßschädigung vor arterieller Thrombose geschützt.

Background Platelets play a crucial role in thrombosis and hemostasis. Their activation at sites of vascular injury prevents life-threatening blood loss and promotes wound healing. However, during vascular diseases, thrombus formation by activated platelets may cause stroke or myocardial infarction. The two sphingosine kinase isoforms, sphingosine kinase 1 and 2 (SphK 1 and 2) catalyze the phosphorylation of sphingosine (Sph) to the bioactive metabolite sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P can either act extracellularly by binding to its 5 known G-Protein-Coupled S1P-Receptors (S1PR1-5) or intracellularly as a second messenger. Although platelets express both Sphk isoforms and secrete large amounts of S1P after stimulation, the (patho-)physiologic role of platelet S1P still remains unclear. Hence, this work addresses the role of SphK 1 and 2 in the regulation of platelet function.

Results Platelets of SphK2-deficient mice have a 100-fold reduction in intracellular S1P levels compared to platelets of SphK1-deficient or wildtype mice. Moreover, Sphk2-deficient platelets totally fail to secrete S1P into the supernatant after stimulation with thrombin. This indicates that SphK2 is the major sphingosinekinase isoform in platelets and responsible for the generation and release of S1P. Interestingly, the secretion of the arachidonic-acid metabolites in response to stimulation by thrombin is reduced in SphK2-deficient platelets as compared to wildtype platelets. Functional testing of SphK2-deficient platelets shows a significant reduction of platelet aggregation while platelet adhesion remains unaltered. Correspondingly, SphK2-deficient mice have significantly decreased thrombusformation *in vivo* after ferric-chlorid-injury of the vessel wall.

Conclusion SphK2 is the major sphingosinekinase isoform in platelets. It is responsible for platelet S1P production and promotes platelet aggregation and thrombusformation. Correspondingly, SphK2-deficient mice are protected from arterial thrombosis after vascular injury with ferric chloride.

Literaturverzeichnis

- Abbe, E. (1873): Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung., Archiv für Mikroskopische Anatomie **9**: 413–418.
- Abramowitz, M. and Davidson, M.W. (2012): Microscopy resource center, Website.
URL: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/sources.html>
- Alemaný, R., van Koppen, C.J., Danneberg, K., Ter Braak, M. and Meyer Zu Heringdorf, D. (2007): Regulation and functional roles of sphingosine kinases., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. **374(5-6)**: 413–28.
- Allende, M.L., Sasaki, T., Kawai, H., Olivera, A., Mi, Y., van Echten-Deckert, G., Hajdu, R., Rosenbach, M., Keohane, C.A., Mandala, S., Spiegel, S. and Proia, R.L. (2004): Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by fty720, Journal of Biological Chemistry **279**(50): 52487–52492.
- Amos, W.B. (2000): Instruments for Fluorescence Imaging, in Protein Localization by Fluorescence Microscopy, V.J. Allen (Ed.), Oxford University Press pp.67-108.
- Aoki, S., Osada, M., M., Kaneko., Ozaki, Y. and Yatomi, Y. (2007): Fluid shear stress enhances the sphingosine 1-phosphate responses in cell-cell interactions between platelets and endothelial cells, Biochemical and Biophysical Research Communications **358**(4): 1054 – 1057.
- Aoki, S., Yatomi, Y., Ohta, M., Osada, M., Kazama, F., Satoh, K., Nakahara, K. and Ozaki, Y. (2005): Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel, Journal of Biochemistry **138**(1): 47–55.
- Bacabac, R.G., Smit, T.H., Cowin, S.C., Van Loon, J.J.W.A., Nieuwstadt, F.T.M., Heethaar, R. and Klein-Nulend, J. (2005): Dynamic shear stress in parallel-plate flow chambers, J Biomech **38**(1): 159–167.

- Baker, G.R., Sullam, P.M. and Levin, J. (1997): A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements., *Am J Hematol* **56**(1): 17–25.
- Banno, Y., Kato, M., Hara, A. and Nozawa, Y. (1998): Evidence for the presence of multiple forms of sph kinase in human platelets., *Biochem. J.* **335**(2): 301–304.
- Barbee, J.H. (1973): The effect of temperature on the relative viscosity of human blood., *Biorheology* **10**(1): 1–5.
- Beljanski, V., Lewis, C. S. and Smith, C. D. (2011): Antitumor activity of sphingosine kinase 2 inhibitor abc294640 and sorafenib in hepatocellular carcinoma xenografts, *cbt* **11**(1538-4047): 524–534.
- Bennett, J.S., Berger, B.W. and Billings, P.C. (2009): The structure and function of platelet integrins, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **7**: 200–205.
- Berdyshev, E.V., Gorshkova, I.A., Garcia, J.G.N., Natarajan, V. and Hubbard, W.C. (2005): Quantitative analysis of sphingoid base-1-phosphates as bisacetylated derivatives by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry* **339**(1): 129 – 136.
- Bergmeier, W., Piffath, C.L., Goerge, T., Cifuni, S.M., Ruggeri, Z.M., Ware, J. and Wagner, D.D. (2006): The role of platelet adhesion receptor gpIb α far exceeds that of its main ligand, von willebrand factor, in arterial thrombosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(45): 16900–16905.
- Blair, P. and Flaumenhaft, R. (2009): Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates, *Blood Rev* **23**(4): 177–189.
- Bland, J.M and Altman, D.G. (2009): Analysis of continuous data from small samples, *BMJ* **338**.
- Busse, R. (1995): *Physiologie des Menschen*, G.Thews and R. Schmidt (Ed.), 26 Aufl., Springer Verlag, Heidelberg (24) pp.498-502.
- Böyum, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g., *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**: 77–89.
- Cardinal, D.C and Flower, R.J. (1979a): The 'electronic platelet aggregometer' [proceedings], *Br J Pharmacol.* **66**(1): 138.

- Cardinal, D.C and Flower, R.J. (1979b): The study of platelet aggregation in whole blood [proceedings], *Br J Pharmacol.* **66**(1): 94–95.
- Chou, J., Mackman, N., Merrill-Skoloff, G., Pedersen, B., Furie, B.C. and Furie, B. (2004): Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation, *Blood* **104**(10): 3190–3197.
- Chuza (2010): Ccd vs. cmos, Website.
URL: <http://www.chuza.cl/blog/wp-content/uploads/2010/11/CCD-VS-CMOS.jpg>
- Cinar, Y., Senyol, A.M. and Duman, K. (2001): Blood viscosity and blood pressure: role of temperature and hyperglycemia, *Am J Hypertens* **14**(5): 433–438.
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.-M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D. and Warwick, C. (1997): Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2, *Laboratory Animals* **31**(1): 1–32.
- Cornelissen, I., Palmer, D., David, T., Wilsbacher, L., Concengco, C., Conley, P., Pandey, A. and Coughlin, S.R. (2010): Roles and interactions among protease-activated receptors and p2ry12 in hemostasis and thrombosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(43): 18605–18610.
- Coughlin, S.R. (2005): Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**(8): 1800–1814.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O. A., Gutkind, J.S. and Spiegel, S. (1996): Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate, *Nature* **381**(6585): 800–803.
- Cyster, J.G. (2005): Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs, *Annual Review of Immunology* **23**(1): 127–159.
- Cyster, J.G. and Schwab, S.R. (2012): Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs, *Annual Review of Immunology* **30**(1): 69–94.
- Davidson, Michael W. (2012): Molecular expressions optical microscopy primer, Website.
URL: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>
- de Groot, P. and Sixma, J.J. (2007): Platelets, A.D. Michelson (Ed.), 2 Aufl., Academic Press p.575.

- Denis, C.V. and Wagner, D.D. (2007): Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **27**(4): 728–739.
- Deutschman, D.H., Carstens, J.S., Klepper, R.L., Smith, W.S., Page, M.T., Young, T.R., Gleason, L.A., Nakajima, N. and Sabbadini, R.A. (2003): Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate, Am Heart J **146**(1): 62–68.
- Diehl, P., Olivier, C., Halscheid, C., Helbing, T., Bode, C. and Moser, M. (2010): Clopidogrel affects leukocyte dependent platelet aggregation by p2y12 expressing leukocytes, Basic Research in Cardiology **105**: 379–387: 10.1007/s00395-009-0073-8.
- Don, A.S. and Rosen, H. (2009): A lipid binding domain in sphingosine kinase 2, Biochemical and Biophysical Research Communications **380**(1): 87 – 92.
- Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. and Furie, B. C. (2006): Glycoprotein vi-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo, Blood **107**(10): 3902–3906.
- English, D., Welch, Z., Kovala, A.T., Harvey, K., Volpert, O.V., Bridley, D.N. and Garcia, J.G.N. (2000): Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis, The FASEB Journal **14**(14): 2255–2265.
- Fahraeus, R. and Lindqvist, T. (1931): The viscosity of the blood in narrow capillary tubes, American Journal of Physiology – Legacy Content **96**(3): 562–568.
- Farrehi, P.M., Ozaki, C.K., Carmeliet, P. and Fay, W.P. (1998): Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice, Circulation **97**(10): 1002–1008.
- Fay, W.P., Parker, A.C., Ansari, M.N., Zheng, X. and Ginsburg, D. (1999): Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice, Blood **93**(6): 1825–1830.
- Festing, M.F.W. (1998a): Inbred strains of mice, Website.
URL: <http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/BALB.shtml>

- Festing, M.F.W. (1998b): Inbred strains of mice, Website.
URL: <http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml>
- Franke, T. and Wixforth, A. (2007): Das labor auf dem chip: Mikrofluidik, Physik in unserer Zeit **38**(2): 88–94.
- French, K.J., Upson, J.J., Keller, S.N., Zhuang, Y., Yun, J.K. and Smith, C.D. (2006): Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **318**(2): 596–603.
- French, K.J., Zhuang, Y., Maines, L.W., Gao, P., Wang, W., Beljanski, V., Upson, J. J., Green, C. L., Keller, S. N. and Smith, C. D. (2010): Pharmacology and antitumor activity of abc294640, a selective inhibitor of sphingosine kinase-2, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **333**(1): 129–139.
- Fukuda, Y., Aoyama, Y., Wada, A. and Igarashi, Y. (2004): Identification of pecam-1 association with sphingosine kinase 1 and its regulation by agonist-induced phosphorylation, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1636**(1): 12 – 21.
- Fukuda, Y., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2003): Distribution of sphingosine kinase activity in mouse tissues: contribution of sphk1, Biochemical and Biophysical Research Communications **309**(1): 155 – 160.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X03015511>
- Gachet, C. (2008): P2 receptors, platelet function and pharmacological implications, Thrombosis and Haemostasis **99/3**: 466–472.
- Gao, P., Peterson, Y. K., Smith, R. A. and Smith, C. D. (2012): Characterization of isoenzyme-selective inhibitors of human sphingosine kinases, PLoS ONE **7**(9): e44543.
- Gleissner, C.A., von Hundelshausen, P. and Ley, K. (2008): Platelet chemokines in vascular disease, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **28**(11): 1920–1927.
- Golfier, S., Kondo, S., Schulze, T., Takeuchi, T., Vassileva, G., Achtman, A.H., Gräler, M.H., Abbondanzo, S.J., Wiekowski, M., Kremmer, E., Endo, Y., Lira, S.A., Bacon, K.B. and Lipp, M. (2010): Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor s1p4, The FASEB Journal **24**(12): 4701–4710.

- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S. and Singh, R.M. (1966): Hydrogen ion buffers for biological research., *Biochemistry* **5**(2): 467–477.
- Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S. and Spiegel, S. (2008): Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal, *The FASEB Journal* **22**(8): 2629–2638.
- Hait, N.C., Bellamy, A., Milstien, S., Kordula, T. and Spiegel, S. (2007): Sphingosine kinase type 2 activation by erk-mediated phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry* **282**(16): 12058–12065.
- Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S. and Spiegel, S. (2006): Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(12): 2016 – 2026.
- Hau, J. and Van Hoosier, G.L. (1994): *Handbook of Laboratory Animal Science: Animal models*, CRC Press pp. 256-265.
- Hayashi, S., Okada, T., Igarashi, N., Fujita, T., Jahangeer, S. and Nakamura, S. (2002): Identification and characterization of rpk118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein, *Journal of Biological Chemistry* **277**(36): 33319–33324.
- Hänel, P., Andreani, P. and Gräler, M.H. (2007): Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood, *The FASEB Journal* **21**(4): 1202–1209.
- Holmsen, H. and Weiss, H.J. (1979): Secretable storage pools in platelets, *Annual Review of Medicine* **30**(1): 119–134.
- Ikedo, M., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2004): Sphingosine-1-phosphate lyase spl is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**(1): 338 – 343.
- Inoue, S. (2006): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley (Ed.), 3 Aufl., Springer Science+Buisness Media, LCC p.1.
- Invitrogen (2012): Fluorescence spectraviewer: Cfda-se, Website.
URL: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

- Italiano, J.E., Lecine, P., Shivdasani, R.A. and Hartwig, J.H. (1999): Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes, *The Journal of Cell Biology* **147**(6): 1299–1312.
- Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Ikeda, M., Sano, T., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2007): Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**(1): 212 – 217.
- Jedlitschky, G., Greinacher, A. and Kroemer, H.K. (2012): Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy, *Blood* **119**(15): 3394–3402.
- Jennings, L.K. and McCabe White, M. (2007): Platelets, A.D. Michelson(Ed.), Bd. 2, Academic Press p.499.
- Jin, J., Quinton, T.M., Zhang, J., Rittenhouse, S.E. and Kunapuli, S.P. (2002): Adenosine diphosphate (adp) -induced thromboxane a2 generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin aIIb β 3 and adp receptors, *Blood* **99**(1): 193–198.
- Jo, S.-K., Bajwa, A., Ye, H., Vergis, A.L., Awad, A.S., Kharel, Y., Lynch, K.R. and Okusa, M.D. (2008): Divergent roles of sphingosine kinases in kidney ischemia-reperfusion injury, *Kidney Int* **75**(2): 167–175.
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Shivdasani, R. A. and von Andrian, U.H. (2007): Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow, *Science* **317**(5845): 1767–1770.
- Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H. and Coughlin, S.R. (1999): Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin, *J Clin Invest.* **103**: 879–887.
- Katritsis, D., Kaiktsis, L., Chaniotis, A., Pantos, J., Efstathopoulos, E.P. and Marmarelis, V. (2007): Wall shear stress: theoretical considerations and methods of measurement, *Prog Cardiovasc Dis* **49**(5): 307–329.
- Kawamori, T., Osta, W., Johnson, K.R., Pettus, B.J., Bielawski, J., Tanaka, T., Wargovich, M.J., Reddy, B.S., Hannun, Y.A., Obeid, L.M. and Zhou, D. (2006): Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis, *The FASEB Journal* **20**(2): 386–388.

- King, S.M., McNamee, R.A., Houg, A.K., Patel, R., Brands, M. and Reed, G.L. (2009): Platelet dense-granule secretion plays a critical role in thrombosis and subsequent vascular remodeling in atherosclerotic mice, *Circulation* **120**(9): 785–791.
- Kobayashi, N., Nishi, T., Hirata, T., Kihara, A., Sano, T., Igarashi, Y. and Yamaguchi, A. (2006): Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner, *Journal of Lipid Research* **47**(3): 614–621.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R. and Spiegel, S. (1998): Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase, *Journal of Biological Chemistry* **273**(37): 23722–23728.
- Kohno, M., Momoi, M., Oo, M.L., Paik, J.-H., Lee, Y.-M., Venkataraman, K., Ai, Y., Ristimaki, A.P., Fyrst, H., Sano, H., Rosenberg, D., Saba, J.D., Proia, R.L. and Hla, T. (2006): Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation, *Molecular and Cellular Biology* **26**(19): 7211–7223.
- Kolesnick, R. (1992): Ceramide: a novel second messenger, *Trends in Cell Biology* **2**(8): 232 – 236.
- Kroll, M.H., Hellums, J.D., McIntire, L.V., Schafer, A.I. and Moake, J.L. (1996): Platelets and shear stress., *Blood* **88**(5): 1525–1541.
- Kurz, K.D., Main, B.W. and Sandusky, G.E. (1990): Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride, *Thrombosis Research* **60**(4): 269 – 280.
- Lai, W.-Q., Irwan, A.W., Goh, H.H., Melendez, A.J., McInnes, I.B. and Leung, B.P. (2009): Distinct roles of sphingosine kinase 1 and 2 in murine collagen-induced arthritis, *The Journal of Immunology* **183**(3): 2097–2103.
- Le Scolan, E., Pchejetski, D., Banno, Y., Denis, N., Mayeux, P., Vainchenker, W., Levade, T. and Moreau-Gachelin, F. (2005): Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression, *Blood* **106**(5): 1808–1816.
- Le Stunff, H., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstien, S. and Spiegel, S. (2002): Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis, *The Journal of Cell Biology* **158**(6): 1039–1049.
- Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A. and Du, X. (2010): Signaling during platelet adhesion and activation, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30**(12): 2341–2349.

- Lichtman, J.W. and Conchello, J.-A. (2005): Fluorescence microscopy., *Nat Methods* **2**(12): 910–919.
- Lindner, V., Fingerle, J. and Reidy, M.A. (1993): Mouse model of arterial injury, *Circulation Research* **73**(5): 792–796.
- Liu, H., Sugiura, M., Nava, V.E., Edsall, L.C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T. and Spiegel, S. (2000): Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform, *Journal of Biological Chemistry* **275**(26): 19513–19520.
- Liu, H., Toman, R.E., Goparaju, S., Maceyka, M., Nava, V.E., Sankala, H., Payne, S.G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S. and Spiegel, S. (2003): Sphingosine kinase type 2 is a putative bh3-only protein that induces apoptosis, *J. Biol. Chem.* S. M304455200.
- Long, J., Darroch, P., Wan, K.F., Kong, K.C., Ktistakis, N., Pyne, N.J. and Pyne, S. (2005): Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools., *Biochem. J.* **391**(1): 25–32.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S. and Spiegel, S. (2012): Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease, *Trends Cell Biol* **22**(1): 50–60.
- Maceyka, M., Nava, V.E., Milstien, S. and Spiegel, S. (2004): Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein, *FEBS Letters* **568**(13): 30 – 34.
- Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H., Milstien, S. and Spiegel, S. (2005): Sphk1 and sphk2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism, *Journal of Biological Chemistry* **280**(44): 37118–37129.
- Mangin, P., Yap, C.L., Nonne, C., Sturgeon, S.A., Goncalves, I., Yuan, Y., Schoenwaelder, S.M., Wright, C.E., Lanza, F. and Jackson, S.P. (2006): Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet gpvi/fergamma-deficiency, *Blood* **107**(11): 4346–4353.
- Massberg, S., Brand, K., Grüner, S., Page, S., Müller, E., Müller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B. and Gawaz, M. (2002): A criti-

- cal role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation, *The Journal of Experimental Medicine* **196**(7): 887–896.
- Massberg, S., Eisenmenger, S., Enders, G., Krombach, F. and Messmer, K. (1998): Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse., *Res Exp Med (Berl)* **198**(1): 23–35.
- Massberg, S., Gawaz, M., Grüner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlhöfer, D., Heinzmann, U. and Nieswandt, B. (2003): A crucial role of glycoprotein vi for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo, *The Journal of Experimental Medicine* **197**(1): 41–49.
- Massberg, S., Konrad, I., Bültmann, A., Schulz, C., Münch, G., Peluso, M., Lorenz, M., Schneider, S., Besta, F., Müller, I., Hu, B., Langer, H., Kremmer, E., Rudelius, M., Heinzmann, U., Ungerer, M. and Gawaz, M. (2004): Soluble glycoprotein vi dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo., *FASEB J* **18**(2): 397–399.
- Massberg, S., Schaerli, P., Knezevic-Maramica, I., Köllnberger, M., Tubo, N., Moseman, E.A., Huff, I.V., Junt, T., Wagers, A.J., Mazo, I.B. and von Andrian, U.H. (2007): Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues, *Cell* **131**(5): 994–1008.
- Massberg, S., Schürzinger, K., Lorenz, M., Konrad, I., Schulz, C., Plesnila, N., Kennerknecht, E., Rudelius, M., Sauer, S., Braun, S., Kremmer, E., Emambokus, N.R., Frampton, J. and Gawaz, M. (2005): Platelet adhesion via glycoprotein iib integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein iib., *Circulation* **112**(8): 1180–1188.
- Merrill, A.H. (2002): De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway, *Journal of Biological Chemistry* **277**(29): 25843–25846.
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S. and Proia, R.L. (2005): Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development, *Molecular and Cellular Biology* **25**(24): 11113–11121.
- Moers, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Wettschureck, N., Gruner, S., Konrad, I., Schulte, V., Aktas, B., Gratacap, M.-P., Simon, M.I., Gawaz, M. and Offermanns, S. (2003):

- G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis, *Nat Med* **9**(11): 1418–1422.
- Motohashi, K., Shibata, S., Ozaki, Y., Yatomi, Y. and Igarashi, Y. (2000): Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, *FEBS Letters* **468**(23): 189 – 193.
- Multiplate (2008): New standard for platelet diagnostics, Website.
URL: <http://www.multiplate.net/de/index.php>
- Murata, N, Sato, K, Kon, J, Tomura, H, Yanagita, M, Kuwabara, A, Ui, M and Okajima, F (2000): Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions., *Biochem. J.* **352**(3): 809–815.
- Murate, T., Banno, Y., T-Koizumi, K., Watanabe, K., Mori, N., Wada, A., Igarashi, Y., Takagi, A., Kojima, T., Asano, H., Akao, Y., Yoshida, S., Saito, H. and Nozawa, Y. (2001): Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **49**(7): 845–855.
- Nieswandt, B. and Watson, S.P. (2003): Platelet-collagen interaction: is gpvi the central receptor?, *Blood* **102**(2): 449–461.
- Nugent, D. and Xu, Y. (2000): Sphingosine-1-phosphate: characterization of its inhibition of platelet aggregation, *Platelets* **11**(4): 226–232.
- Nurden, A. T. (2005): Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **3**(8): 1773–1782.
- Obinata, H. and Hla, T. (2012): Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation, *Seminars in Immunopathology* **34**: 73–91: 10.1007/s00281-011-0287-3.
- Offermanns, S. (2006): Activation of platelet function through g protein-coupled receptors., *Circ Res* **99**(12): 1293–1304.
- Okada, T., Ding, G., Sonoda, H., Kajimoto, T., Haga, Y., Khosrowbeygi, A., Gao, S., Miwa, N., Jahangeer, S. and Nakamura, S. (2005): Involvement of n-terminal-extended form of sphingosine kinase 2 in serum-dependent regulation of cell proliferation and apoptosis, *Journal of Biological Chemistry* **280**(43): 36318–36325.

- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S. and Spiegel, S. (1999): Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival, *The Journal of Cell Biology* **147**(3): 545–558.
- Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S. and Spiegel, S. (1998): Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase, *Journal of Biological Chemistry* **273**(20): 12576–12583.
- Olivera, A. and Spiegel, S. (1993): Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by pdgf and fcs mitogens, *Nature* **365**(6446): 557–560.
- Ono, A., Westein, E., Hsiao, S., Nesbitt, W.S., Hamilton, J.R., Schoenwaelder, S.M. and Jackson, S.P. (2008): Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth, *Blood* **112**(1): 90–99.
- Papaioannou, T.G. and Stefanadis, C. (2005): Vascular wall shear stress: basic principles and methods., *Hellenic J Cardiol* **46**(1): 9–15.
- Pappu, R., Schwab, S.R., Cornelissen, I., Pereira, J.P., Regard, J.B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.-W., Huang, Y., Cyster, J.G. and Coughlin, S.R. (2007): Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate, *Science* **316**(5822): 295–298.
- Pawley, J.B. (2006): *Handbook of biological confocal microscopy*, J.B. Pawley(Ed.), 3 Aufl., Springer Science+Buisness Media, LCC pp.918-931.
- Pettus, B.J., Bielawski, J., Porcelli, A.M., Reames, D.L., JJohnson, K.R., Morrow, J., Chalfant, C.E., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (2003): The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates cox-2 induction and pge2 production in response to tnfalpa, *The FASEB Journal* **17**(11): 1411–1421.
- Pitson, S.M. (2011): Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling, *Trends in Biochemical Sciences* **36**(2): 97 – 107.
- Pitson, S.M., D’andrea, R.J., Vandeleur, L., Moretti, P.A., Xia, P., Gamble, J.R., Vadas, M.A. and Wattenberg, B.W. (2000): Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes., *Biochem. J.* **350**(2): 429–441.

- Pitson, S.M., Moretti, P.A.B., Zebol, J.R., Lynn, H.E., Xia, P., Vadas, M.A. and Wattenberg, B.W. (2003): Activation of sphingosine kinase 1 by erk1/2-mediated phosphorylation, *EMBO J* **22**(20): 5491–5500.
- Pries, A.R., Neuhaus, D. and Gaehtgens, P. (1992): Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **263**(6): H1770–H1778.
- Pushparaj, P.N., Manikandan, J., Tay, H.K., H'ng, S.C., Kumar, S.D., Pfeilschifter, J., Huwiler, A. and Melendez, A.J. (2009): Sphingosine kinase1 is pivotal for fctetari-mediated mast cell signaling and functional responses in vitro and in vivo, *The Journal of Immunology* **183**(1): 221–227.
- Randriamboavonjy, V., Badenhoop, K., Schmidt, H., Geisslinger, G., Fisslthaler, B. and Fleming, I. (2009): The s1p2 receptor expressed in human platelets is linked to the rhoa-rho kinase pathway and is down regulated in type 2 diabetes, *Basic Research in Cardiology* **104**: 333–340.
- Reichmann, Jay (2010): Handbook of optical filters for fluorescence microscopy, Website.
URL: <http://www.chroma.com/resources-support/downloads/filter-handbook>
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J. and Borst, P. (2003): The human multidrug resistance protein mrp4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(16): 9244–9249.
- Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K.A. and Smith, B.R. (1991): Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood, *Blood* **78**(7): 1730–1737.
- Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P.J., Sanna, M.G. and Brown, S. (2009): Sphingosine 1-phosphate receptor signaling, *Annual Review of Biochemistry* **78**(1): 743–768.
- Rusch, T. (2003): Auswirkungen von Haltungssystemen auf die Reproduktion und das Verhalten von Mäusen bei unterschiedlichen Käfiganreicherungen am Modell der DBA/2 Maus, PhD thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Sachinidis, A., Kettenhofen, R., Seewald, S., Gouni-Berthold, I., Schmitz, U., Seul, C., Ko, Y. and Vetter, H. (1999): Evidence that lipoproteins are carriers of bioactive factors, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **19**(10): 2412–2421.

- Sakariassen, K.S., Aarts, P.A., de Groot, P.G., Houdijk, W.P. and Sixma, J.J. (1983): A perfusion chamber developed to investigate platelet interaction in flowing blood with human vessel wall cells, their extracellular matrix, and purified components., *J Lab Clin Med* **102**(4): 522–535.
- Samy, E.T., Meyer, C.A., Caplazi, P., Langrish, C.L., Lora, J.M., Bluethmann, H. and Peng, S.L. (2007): Cutting edge: modulation of intestinal autoimmunity and il-2 signaling by sphingosine kinase 2 independent of sphingosine-1-phosphate, *The Journal of Immunology* **179**(9): 5644–5648.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F. and Ruggeri, Z.M. (1998): Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow., *Cell* **94**(5): 657–66.
- Savage, B., Saldívar, E. and Ruggeri, Z.M. (1996): Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von willebrand factor, *Cell* **84**(2): 289–297.
- Schulz, C., Heiss, E., Gaertner, F., Orban, M., v. Bruehl, Marie Luise, Schramm, P. and Massberg, S. (2009): Novel methods for assessment of platelet and leukocyte function under flow - application of epifluorescence and two-photon microscopy in a small volume flow chamber model, *The Open Biology Journal* **2**: 130–136.
- Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y. and Cyster, J.G. (2005): Lymphocyte sequestration through s1p lyase inhibition and disruption of s1p gradients, *Science* **309**(5741): 1735–1739.
- Shaaban, A.M. and Duerinckx, A.J. (2000): Wall shear stress and early atherosclerosis, *American Journal of Roentgenology* **174**(6): 1657–1665.
- Shivdasani, R.A., Rosenblatt, M.F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C.W., Hunt, P., Saris, C.J.M. and Orkin, S.H. (1995): Transcription factor nf-e2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/mgdf in megakaryocyte development, *Cell* **81**(5): 695 – 704.
- Sibbing, D., Braun, S., Jawansky, S., Vogt, W., Mehilli, J., Schömig, A., Kastrati, A. and von Beckerath, N. (2008): Assessment of adp-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment, *Thrombosis and Haemostasis* **99**(1): 121–126.

- Stahelin, R.V., Hwang, J.H., Kim, J.-H., Park, Z.-Y., Johnson, K.R., Obeid, L.M. and Cho, W. (2005): The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1, *J. Biol. Chem. S.* M507574200.
- Stöcker, H. (2004): Taschenbuch der Physik, 5 Aufl., Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main pp.185-195.
- Sternberg, P.E and Levin, J. (1989): Mechanisms of platelet production, *Blood Cells* **15**: 23–47.
- Strub, G.M., Maceyka, M., Hait, N.C., Milstien, S. and Spiegel, S. (2010): Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate, *Adv Exp Med Biol.* **688**: 141–155.
- Sutherland, C.M., Moretti, P.A.B., Hewitt, N.M., Bagley, C.J., Vadas, M.A. and Pitson, S.M. (2006): The calmodulin-binding site of sphingosine kinase and its role in agonist-dependent translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane, *Journal of Biological Chemistry* **281**(17): 11693–11701.
- Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H. and Coffman, T.M. (1998): Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane a₂, *The Journal of Clinical Investigation* **102**(11): 1994–2001.
- Tsakiris, D., Scudder, L., Hodivala-Dilke, K., O. Hynes, R. and Coller, B.S. (1999): Hemostasis in the mouse (*mus musculus*): a review, *Thrombosis and Haemostasis* **81/2**: 165–324.
- Ulrych, T., Böhm, A., Polzin, A., Daum, G., Nüssing, R. M., Geisslinger, G., Hohlfeld, T., Schrör, K. and Rauch, B.H. (2011): Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **9**(4): 790–798.
- Venkataraman, K., Lee, Y.-M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H.L., Parikh, N.S., Habrukowich, C. and Hla, T. (2008): Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate, *Circulation Research* **102**(6): 669–676.
- Venkataraman, K., Thangada, S., Michaud, J., Oo, M.L., Ai, Y., Lee, Y.-M., Wu, M., Parikh, N.S., Khan, F., Proia, R.L. and Hla, T. (2006): Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular s1p gradient, *Biochem J* **397**(3): 461–471.

- Wadgaonkar, R., Patel, V., Grinkina, N., Romano, C., Liu, J., Zhao, Y., Sammani, S., Garcia, J.G.N. and Natarajan, V. (2009): Differential regulation of sphingosine kinases 1 and 2 in lung injury, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **296**(4): L603–L613.
- Wang, X.-Q. and Duan, X.-M., Liu, L.-H., Fang, Y.-Q. and Tan, Y. (2005): Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling., *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**(6): 379–385.
- Ware, J. (2004): Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice, *Thrombosis and Haemostasis* **92/3 (Sept)**: 435–671.
- Weiss, E.J., Hamilton, J.R., Lease, K.E. and Coughlin, S.R. (2002): Protection against thrombosis in mice lacking par3, *Blood* **100**(9): 3240–3244.
- Wells, R.E. and Merrill, E.W. (1962): Influence of flow properties of blood upon viscosity-hematocrit relationships, *The Journal of Clinical Investigation* **41**(8): 1591–1598.
- Whiss, P.A. and Andersson, R.G.G. (2002): Divalent cations and the protein surface coordinate the intensity of human platelet adhesion and p-selectin surface expression., *Blood Coagul Fibrinolysis* **13**(5): 407–416.
- Whitesides, G.M. and Stroock, A.D. (2001): Flexible methods for microfluidics, *Physics Today* **54**(6): 42–48.
- Woollard, K.J., Sturgeon, S., Chin-Dusting, J.P.F., Salem, H.H. and Jackson, S.P. (2009): Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury, *Journal of Biological Chemistry* **284**(19): 13110–13118.
- Wootton, D.M. and Ku, D.N. (1999): Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis, *Annual Review of Biomedical Engineering* **1**(1): 299–329.
- Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y. and Kume, S. (1997a): Sphingosine-1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum, *Journal of Biochemistry* **121**(5): 969–973.
- Yatomi, Y., Ohmori, T., Rile, G., Kazama, F., Okamoto, H., Sano, T., Satoh, K., Kume, S., Tigyi, G., Igarashi, Y. and Ozaki, Y. (2000): Sphingosine-1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells, *Blood* **96**(10): 3431–3438.

- Yatomi, Y., Ruan, F., Hakomori, S. and Igarashi, Y. (1995): Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets, *Blood* **86**(1): 193–202.
- Yatomi, Y., Yamamura, S., Ruan, F. and Igarashi, Y. (1997): Sphingosine-1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid, *Journal of Biological Chemistry* **272**(8): 5291–5297.
- Zemann, B., Kinzel, B., Müller, M., Reuschel, R., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Bornancin, F., Baumruker, T. and Billich, A. (2006): Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug fty720., *Blood* **107**(4): 1454–1458.
- Zemann, B., Urtz, N., Reuschel, R., Mechtcheriakova, D., Bornancin, F., Badegruber, R., Baumruker, T. and Billich, A. (2007): Normal neutrophil functions in sphingosine kinase type 1 and 2 knockout mice, *Immunology Letters* **109**(1): 56 – 63.
- Zhang, H., Desai, N.N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G. and Spiegel, S. (1991): Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation., *The Journal of Cell Biology* **114**(1): 155–167.
- Zhang, L., Orban, M., Lorenz, M., Barocke, V., Braun, D., Urtz, N., Schulz, C., von Brühl, M.-L., Tirniceriu, A., Gaertner, F., Proia, R.L., Graf, T., Bolz, S.-S., Montanez, E., Prinz, M., Müller, A., von Baumgarten, L., Billich, A., Sixt, M., Fässler, R., von Andrian, U. H., Junt, T. and Massberg, S. (2012): A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor s1pr1 in mouse thrombopoiesis, *The Journal of Experimental Medicine* **209**(12): 2165–2181.
- Zhou, L. and Schmaier, A.H. (2005): Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma, *American Journal of Clinical Pathology* **123**(2): 172–183.
- Ziegler, A., Lange, S. and Bender, R. (2007): Überlebenszeitanalyse: Der log-rang-test, *Dtsch Med Wochenschr* **132**: e39–e41.

Anhang

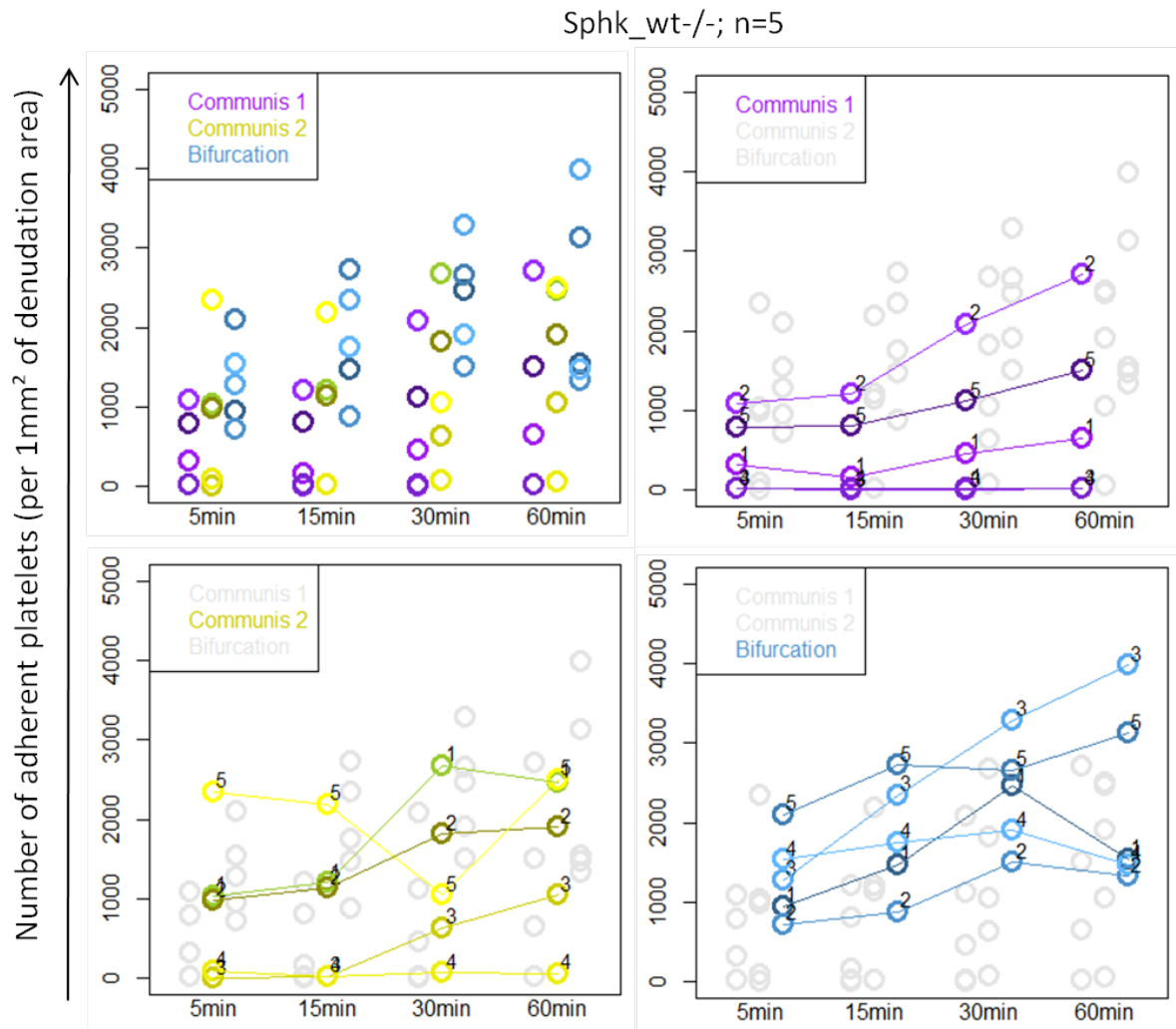


Abbildung 5.1 – Einzeltieranalyse der adhärenen Thrombozyten von Wildtyptieren nach Denudation der Arteria Carotis Communis in den Bereichen Communis 1, Communis 2 und Bifurcation. Es ist die Anzahl adhärenen Thrombozyten (= Thrombozytenzahl pro 1 mm²) im Zeitraum von 5-60min dargestellt. Man erkennt eine Zunahme der adhärenen Thrombozyten mit wachsender Dauer nach Denudation. Die Darstellungsweise verdeutlicht die Schwankung der Maximalwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten zwischen den untersuchten Tieren.

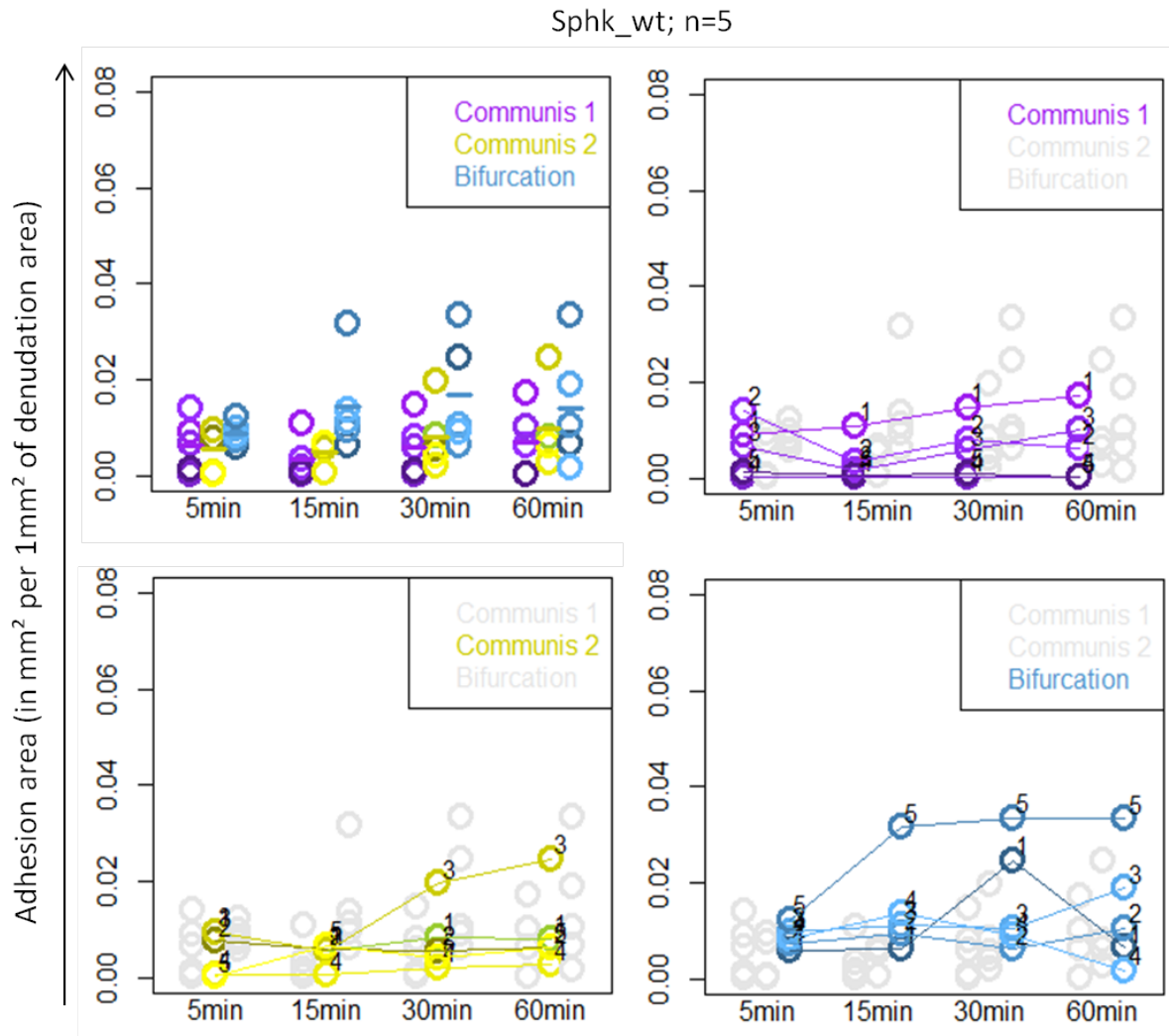


Abbildung 5.2 – Einzeltieranalyse der Adhäsionsfläche von Wildtyp-Thrombozyten nach Denudation der Arteria Carotis Communis in den Bereichen Communis 1, Communis 2 und Bifurcation. Es ist die Fläche adhärenter Thrombozyten (in mm² pro 1 mm²) im Zeitraum von 5-60min dargestellt. Die Fläche der adhärenter Thrombozyten nimmt mit wachsender Dauer nach Denudation nur minimal zu. Die verwendete, automatisierte Messung der Fläche mittels CapImage ermöglicht somit nur eine schlechte Trennung der verschiedenen Zeitpunkte.

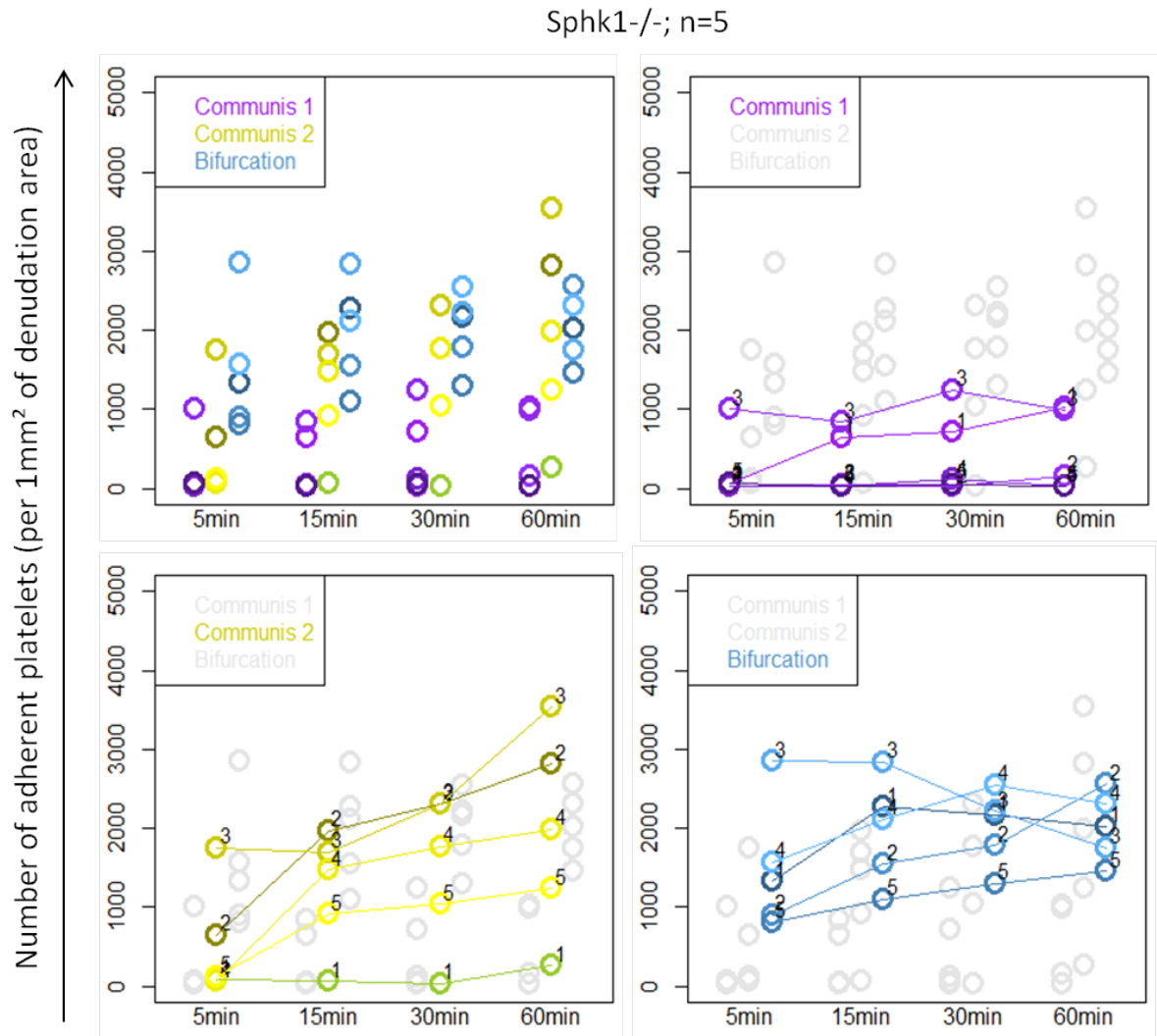


Abbildung 5.3 – Einzeltieranalyse der adhärenen Thrombozyten SphK1-defizienter Tiere nach Denudation der Arteria Carotis Communis in den Bereichen Communis 1, Communis 2 und Bifurcation. Es ist die Anzahl adhärenen Thrombozyten (= Mittelwerte der Thrombozytenzahl pro 1 mm²) im Zeitraum von 5-60min dargestellt. Man erkennt eine Zunahme der adhärenen Thrombozyten mit wachsender Dauer nach Denudation. Die Darstellungsweise verdeutlicht die Schwankung der Maximalwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten zwischen den untersuchten Tieren.

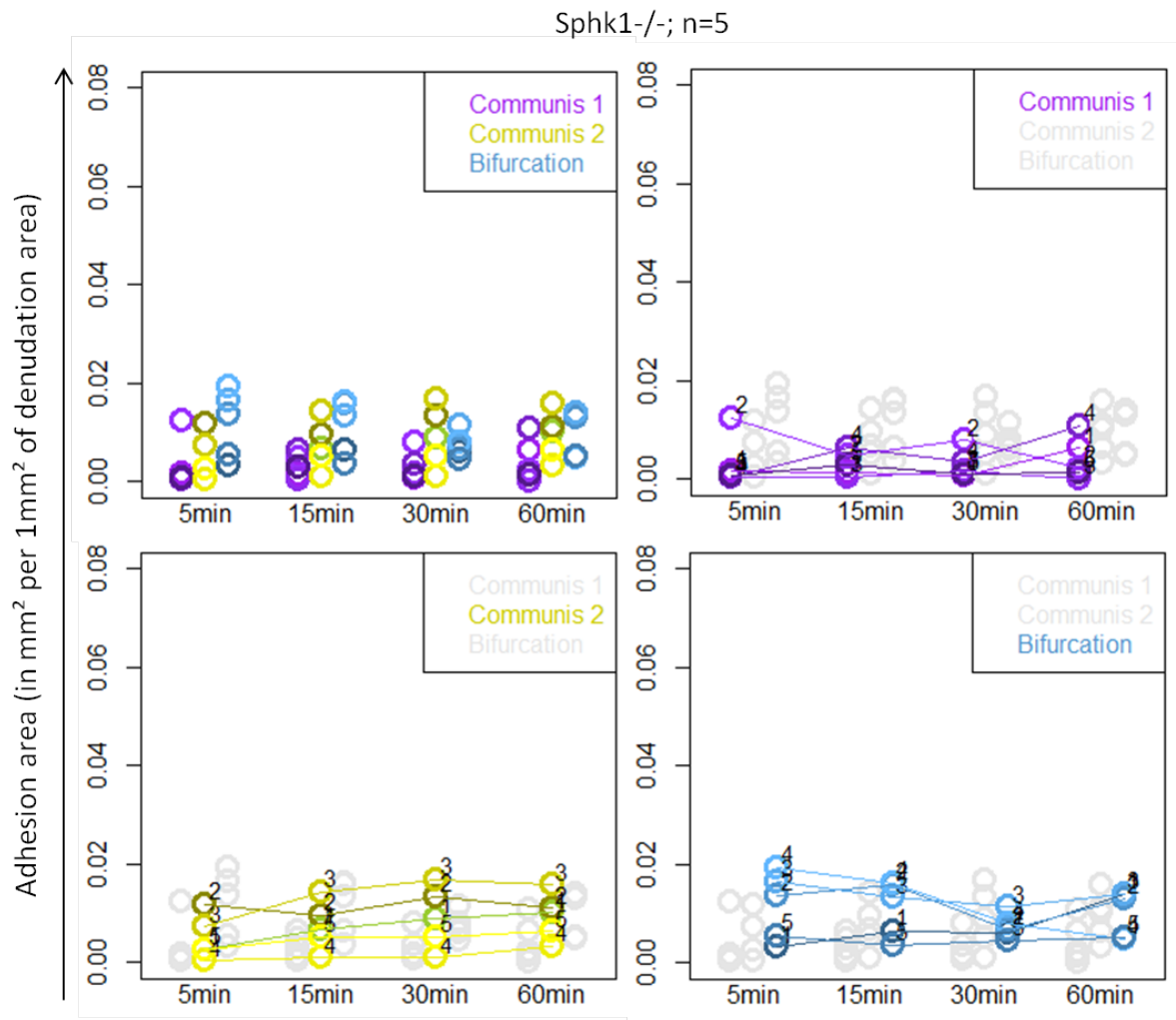


Abbildung 5.4 – Einzeltieranalyse der Adhäsionsfläche SphK1-defizienter-Thrombozyten nach Denudation der Arteria Carotis Communis in den Bereichen Communis 1, Communis 2 und Bifurcation. Es ist die Fläche adhärenter Thrombozyten (in mm^2 pro 1 mm^2) im Zeitraum von 5-60min dargestellt. Die Fläche der adhärenter Thrombozyten nimmt mit wachsender Dauer nach Denudation nur minimal zu. Die verwendete, automatisierte Messung der Fläche mittels CapImage ermöglicht somit nur eine schlechte Trennung der verschiedenen Zeitpunkte.

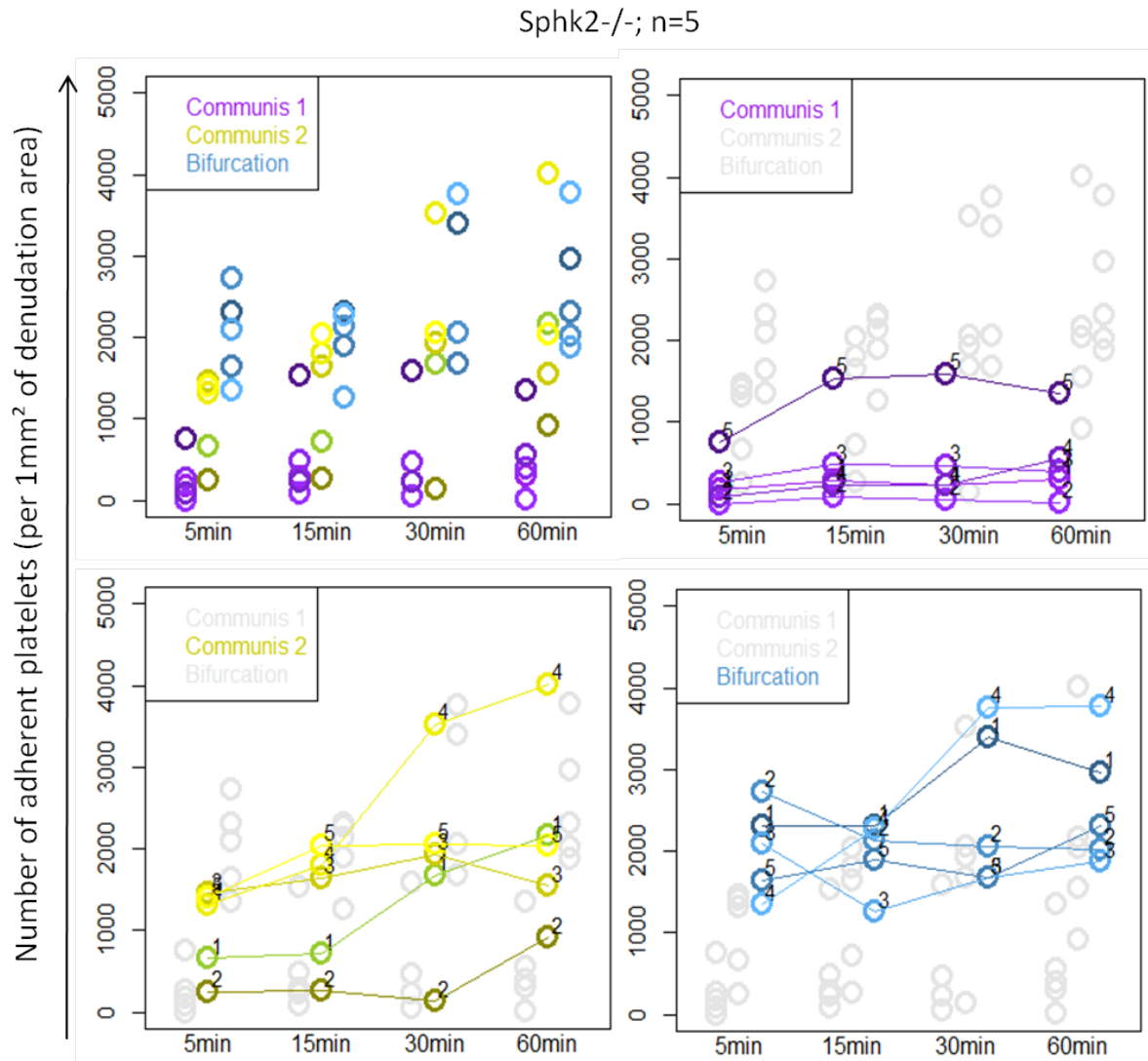


Abbildung 5.5 – Einzeltieranalyse der adhärenen Thrombozyten SphK2-defizienter Tiere nach Denudation der Arteria Carotis Communis in den Bereichen Communis 1, Communis 2 und Bifurcation. Es ist die Anzahl adhärenen Thrombozyten (= Mittelwerte der Thrombozytenzahl pro 1 mm²) im Zeitraum von 5-60min dargestellt. Man erkennt eine Zunahme der adhärenen Thrombozyten mit wachsender Dauer nach Denudation. Die Darstellungsweise verdeutlicht die Schwankung der Maximalwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten zwischen den untersuchten Tieren.

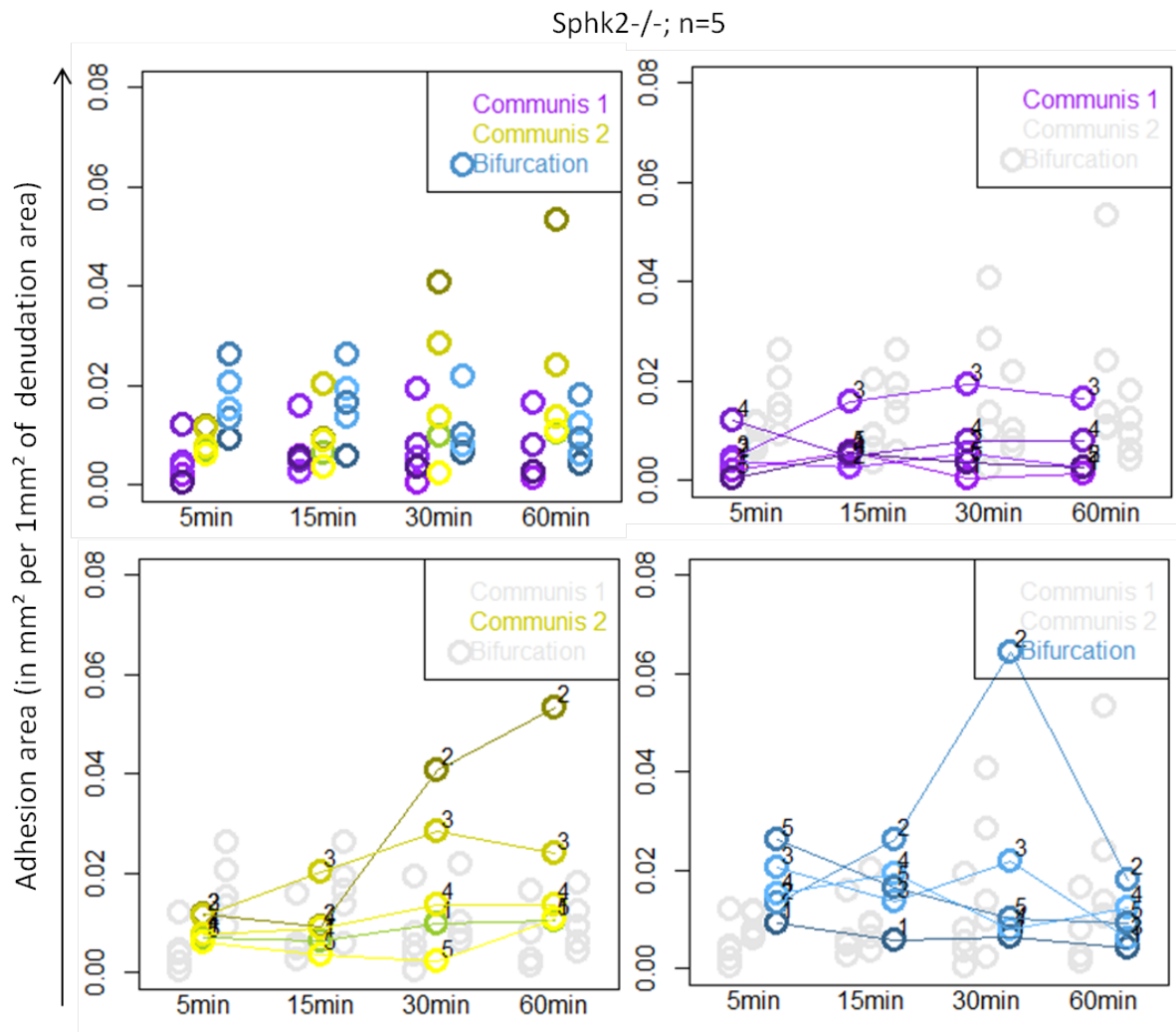


Abbildung 5.6 – Einzeltieranalyse der Adhäsionsfläche SphK2-defizienter-Thrombozyten nach Denudation der Arteria Carotis Communis in den Bereichen Communis 1, Communis 2 und Bifurcation. Es ist die Fläche adhärenter Thrombozyten (in mm² pro 1 mm²) im Zeitraum von 5-60min dargestellt. Die Fläche der adhärenter Thrombozyten nimmt mit wachsender Dauer nach Denudation nur minimal zu. Die verwendete, automatisierte Messung der Fläche mittels CapImage ermöglicht somit nur eine schlechte Trennung der verschiedenen Zeitpunkte.

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Plasma-S1P Messung (LC-MS/MS)
C57BL/6 Sphk1-/-	n=2	weiblich (n=2)	7-10 Wochen	Plasma-S1P Messung (LC-MS/MS)
C57BL/6 Sphk2-/-	n=2	weiblich (n=2)	7-10 Wochen	Plasma-S1P Messung (LC-MS/MS)

Tabelle 5.1 – Versuchsplanung zur Plasma-S1P Messung

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Plasma-S1P Messung (LC-MS/MS)
NE-F2-/-	n=3	weiblich (n=2)	7-10 Wochen	Plasma-S1P Messung (LC-MS/MS)
NE-F2- /- + C57BL/6	n=3	weiblich (n=2)	7-10 Wochen	Plasma-S1P Messung (LC-MS/MS)

Tabelle 5.2 – Versuchsplanung zur Plasma-S1P Messung NE-F2-/- Tiere

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=2	weiblich (n=2)	7-10 Wochen	Thrombozyten-S1P Mes- sung (LC-MS/MS)
C57BL/6 Sphk1-/-	n=2	weiblich (n=2)	7-10 Wochen	Thrombozyten-S1P Mes- sung (LC-MS/MS)
C57BL/6 Sphk2-/-	n=2	weiblich (n=2)	7-10 Wochen	Thrombozyten-S1P Mes- sung (LC-MS/MS)

Tabelle 5.3 – Versuchsplanung zur Thrombozyten-S1P Messung

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Erythrozyten-S1P Mes- sung (LC-MS/MS)
C57BL/6 Sphk1-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Erythrozyten-S1P Mes- sung (LC-MS/MS)
C57BL/6 Sphk2-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Erythrozyten-S1P Mes- sung (LC-MS/MS)

Tabelle 5.4 – Versuchsplanung zur Erythrozyten-S1P Messung

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	SphK-Aktivitätsmessung der Thrombozyten
C57BL/6 Sphk1-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	SphK-Aktivitätsmessung der Thrombozyten
C57BL/6 Sphk2-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	SphK-Aktivitätsmessung der Thrombozyten

Tabelle 5.5 – Versuchsplanung zur SphK-Aktivitätsmessung in Thrombozyten

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=4	weiblich (n=4)	7-10 Wochen	SphK-Messung der Erythrozyten (Dünnschichtchromatographie)
C57BL/6 Sphk1-/-	n=4	weiblich (n=4)	7-10 Wochen	SphK-Messung der Erythrozyten (Dünnschichtchromatographie)
C57BL/6 Sphk2-/-	n=4	weiblich (n=4)	7-10 Wochen	SphK-Messung der Erythrozyten (Dünnschichtchromatographie)

Tabelle 5.6 – Versuchsplanung zur SphK-Aktivitätsmessung in Erythrozyten

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Thromboxan B2-& Prostaglandin E2-Freisetzung (ELISA)
C57BL/6 Sphk1-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Thromboxan B2-& Prostaglandin E2-Freisetzung (ELISA)
C57BL/6 Sphk2-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	Thromboxan B2-& Prostaglandin E2-Freisetzung (ELISA)

Tabelle 5.7 – Versuchsplanung zur TXB2- und PGE2-Freisetzung aus Thrombozyten

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=4	weiblich (n=4)	7-10 Wochen	Arachidonsäurefreisetzung (Liquid Scintillation Analyzer)
C57BL/6 Sphk1-/-	n=4	weiblich (n=4)	7-10 Wochen	Arachidonsäurefreisetzung (Liquid Scintillation Analyzer)
C57BL/6 Sphk2-/-	n=4	weiblich (n=4)	7-10 Wochen	Arachidonsäurefreisetzung (Liquid Scintillation Analyzer)

Tabelle 5.8 – Versuchsplanung zur Arachidonsäurefreisetzung aus Thrombozyten

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	ATP-Freisetzung (ATP Bioluminescence Assay)
C57BL/6 Sphk1-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	ATP-Freisetzung (ATP Bioluminescence Assay)
C57BL/6 Sphk2-/-	n=3	weiblich (n=3)	7-10 Wochen	ATP-Freisetzung (ATP Bioluminescence Assay)

Tabelle 5.9 – Versuchsplanung zur ATP-Freisetzung Thrombozyten

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
BalbC Sphk wt	n=6	männlich (n=3) weiblich (n=3)	10-20 Wochen	Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>
BalbC Sphk1-/-	n=6	männlich (n=3) weiblich (n=3)	10-20 Wochen	Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>
BalbC Sphk2-/-	n=6	männlich (n=3) weiblich (n=3)	10-20 Wochen	Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>

Tabelle 5.10 – Versuchsplanung zur Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen *in vitro*

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
BalbC Sphk Wt	n=5	männlich (n=3) weiblich (n=2)	10-20 Wochen	Thrombozytenaggregation <i>in vitro</i>
BalbC Sphk1-/-	n=5	männlich (n=3) weiblich (n=2)	10-20 Wochen	Thrombozytenaggregation <i>in vitro</i>
BalbC Sphk2-/-	n=5	männlich (n=3) weiblich (n=2)	10-20 Wochen	Thrombozytenaggregation <i>in vitro</i>

Tabelle 5.11 – Versuchsplanung zur Vollblutaggregation *in vitro*

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk Wt	n=8	männlich (n=3) weiblich (n=5)	10-20 Wochen	Thrombozytenaggregation <i>in vitro</i>
C57BL/6 Sphk1-/-	n=8	männlich (n=3) weiblich (n=5)	10-20 Wochen	Thrombozytenaggregation <i>in vitro</i>
C57BL/6 Sphk2-/-	n=8	männlich (n=3) weiblich (n=5)	10-20 Wochen	Thrombozytenaggregation <i>in vitro</i>

Tabelle 5.12 – Versuchsplanung zur Vollblutaggregation *in vitro*

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
BalbC Sphk wt	n=5 (Empfänger) n=5 (Spender)	männlich (n=3) weiblich (n=2)	8-12 Wochen	Thrombozytenadhäsion und - aggregation <i>in vivo</i>
BalbC Sphk1-/-	n=5 (Empfänger) n=5 (Spender)	männlich (n=3) weiblich (n=2)	8-12 Wochen	Thrombozytenadhäsion und - aggregation <i>in vivo</i>
BalbC Sphk2-/-	n=5 (Empfänger) n=5 (Spender)	männlich (n=3) weiblich (n=2)	8-12 Wochen	Thrombozytenadhäsion und - aggregation <i>in vivo</i>

Tabelle 5.13 – Versuchsplanung zur Endotheldenudation (Drahtmodell) *in vivo*

Stamm	Anzahl	Geschlecht	Alter	Art der Messung
C57BL/6 Sphk wt	n=8 (Empfänger) n=8 (Spender)	männlich (n=4) weiblich (n=4)	8-12 Wochen	Gefäßokklusion und -rekanalisation <i>in vivo</i>
C57BL/6 Sphk1-/-	n=6 (Empfänger) n=6 (Spender)	männlich (n=3) weiblich (n=3)	8-12 Wochen	Gefäßokklusion und -rekanalisation <i>in vivo</i>
C57BL/6 Sphk2-/-	n=4 (Empfänger) n=4 (Spender)	männlich (n=3) weiblich (n=1)	8-12 Wochen	Gefäßokklusion und -rekanalisation <i>in vivo</i>

Tabelle 5.14 – Versuchsplanung zur FeCl₃ - Läsion *in vivo*